



Mise au point d'un dosage d'activité kinase de la protéine DYRK1A et Régulation épigénétique de l'expression du gène codant le facteur de transcription ISL1

Laure Tabouy

► To cite this version:

Laure Tabouy. Mise au point d'un dosage d'activité kinase de la protéine DYRK1A et Régulation épigénétique de l'expression du gène codant le facteur de transcription ISL1. Neurobiologie. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2012. Français. NNT : . tel-00777732

HAL Id: tel-00777732

<https://theses.hal.science/tel-00777732>

Submitted on 18 Jan 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE PARIS DIDEROT (Paris VII)
UFR Sciences du vivant - Biochimie

Année 2012

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DIDEROT (Paris VII)

Ecole Doctorale Biochimie, Biothérapies, Biologie Moléculaire et Infectiologie (B3Mi)
Biomolécules, Biologie structurales, Pathologies et Biothérapies

Présentée et soutenue publiquement par

Laure TABOUY

Le 19 décembre 2012

**Mise au point d'un dosage de l'activité kinase de la
protéine DYRK1A et Régulation épigénétique de
l'expression du gène codant le facteur de
transcription ISL1.**

Thèse codirigée par M. Julien DAIROU et M. Jean-Noël LAVERRIERE

Biologie Fonctionnelle et Adaptative
Equipe 3 « Physiologie de l'Axe Gonadotrope »
Equipe 6 « Réponses Moléculaires et Cellulaires aux Xénobiotiques »

JURY

M. Patrick VICART	Président
M. Bertrand FRIGUET	Rapporteur
M. Youssef ANOUAR	Rapporteur
M. Thierry FOULON	Examineur
M. Julien DAIROU	Examineur
M. Jean-Noël LAVERRIERE	Examineur

Je voudrais remercier en premier lieu Monsieur Jean-Noël Laverrière et Monsieur Julien Dairou pour m'avoir encadrée, soutenue, accueillie dans leur équipe et fait confiance tout au long de ce travail de thèse. Je les remercie de m'avoir permis de travailler à leur côté et de m'avoir fait partager avec une grande patience et une grande délicatesse leur savoir-faire scientifique et professionnel.

Je souhaite par ces mots remercier Madame Joëlle Cohen-Tannoudji et Monsieur Jean-Marie Dupret pour m'avoir fait confiance et pour m'avoir donné la chance de travailler au sein de leur laboratoire respectif. Je les remercie de m'avoir permis de continuer ma thèse malgré une situation difficile au départ, merci pour votre patience et votre disponibilité face à cette situation.

Je voudrais adresser mes remerciements à Monsieur Patrick Vicart, Professeur à l'université Paris Diderot-Paris 7, qui au-delà de l'honneur qu'il me fait de présider mon jury de thèse, m'a permis de continuer ma thèse. Je le remercie pour son écoute et sa patience.

Je désire adresser mes sincères remerciements à Monsieur Youssef Anouar, Directeur de Recherche à l'INSERM et Monsieur Bertrand Friguet, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, pour avoir accepté la tâche de rapporteur. Sachant leur haute compétence dans les domaines de la Neuroendocrinologie, de la biologie cellulaire et du vieillissement, je suis profondément reconnaissante et honorée de leur présence et de bénéficier de leurs remarques et appréciations. J'adresse également mes remerciements à Monsieur Thierry Foulon, professeur de l'Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, d'avoir accepté le rôle d'examineur au sein de mon jury, votre présence m'honore réellement.

C'est avec un profond respect que je remercie tout particulièrement Monsieur Bruno Quérat, Monsieur Christian Bleux, Monsieur Richard Wargnier, Madame Solange Magre, Madame Anne-Laure Schang, Madame Marie-Claude Chenut, Madame Linh Chi Bui et Monsieur Florent Busi pour leur accueil au sein de leur box et de leur équipe. Je les remercie du fond du cœur pour leurs collaborations autant scientifiques et professionnelles qu'amicales qui m'ont permises de mener à bien ce travail de thèse.

Je remercie tous les membres des équipes 3 « Physiologie de l'Axe Gonadotrope » et 6 « Réponses Moléculaires et Cellulaires aux Xénobiotiques » de l'Unité BFA pour leur accueil, les discussions autant professionnelles qu'amicales, leur soutien et leurs conseils. Merci à chacun.

Ce travail de thèse est l'aboutissement d'un projet initialisé il y a de cela quelques années et au cours de mon parcours universitaire et professionnel, j'ai eu la chance et l'immense privilège de rencontrer des personnes qui par leur professionnalisme, leur patience, leur disponibilité et leur générosité m'ont permises d'avancer, de me découvrir et d'arriver à l'aboutissement de ce projet. C'est à chacune de ces personnes que je souhaite maintenant adresser mes plus sincères remerciements. Je souhaite remercier tout particulièrement deux personnes, Madame Sylvie Attucci, Maître de conférences INSERM à l'Université de Tours, et Madame Nathalie Heuzé-Vourc'h, Chargée de Recherche de l'INSERM à l'université de Tours, qui m'ont épaulée, aidée, encouragée et poussée à me réaliser professionnellement et personnellement, c'est avec grande émotion que je les remercie personnellement.

De façon plus personnelle, mes remerciements vont à mes amis, qui m'ont épaulée, soutenue, écoutée, je remercie chacun personnellement car leurs amitiés me sont précieuses. Enfin, j'adresse mes remerciements aux membres de ma famille Lancelot et Guidon, à mes parents, les Drs Philippe et Marie-Pascale Tabouy, qui au-delà des tempêtes, des crises, des rires et des bonnes nouvelles ont su me soutenir et m'aider à grandir en m'apprenant à me relever plus haut et plus loin. Je les remercie du fond du cœur de m'avoir éduquée dans la Foi, dans le respect et l'accueil de l'autre, dans l'émerveillement de l'inconnu et dans la découverte du monde. Je les remercie pour leur présence à mes côtés et pour m'avoir transmise la passion de la médecine et du travail. Mes pensées et mes remerciements vont également à mes frères et sœurs, Emmanuelle, Tiphaine, Timothée et Briac, merci à chacun de vous pour ce que vous êtes. Enfin, je souhaiterais remercier mon grand-père, le Dr Yves Guidon, qui a été le premier à voir en moi le chercheur que je souhaite devenir.

Résumé

Mise au point d'un dosage de l'activité kinase de la protéine DYRK1A : un candidat pour le retard mental et la dégénérescence dans le Syndrome de Down.

Le Syndrome de Down est une maladie chromosomique congénitale ayant pour cause première la présence d'un chromosome 21 surnuméraire. Ce chromosome comporte plus de 271 gènes dont un certain nombre sont essentiels au cours de l'embryogénèse. C'est l'aneuploïdie la plus courante avec une prévalence de 1/700 naissances ; elle est caractérisée par un ensemble de défauts développementaux incluant des anomalies cardiaques congénitales, un retard mental avec un quotient intellectuel compris entre 25 et 80, des anomalies cranio-faciales. Par ailleurs, on observe chez ces patients une précocité dans l'apparition de pathologies dégénératives et neurodégénératives (signes de vieillissement dès 8 ans, maladie d'Alzheimer dès 30 ans). L'établissement des cartes de corrélation génotypes/phénotypes chez les patients atteints du Syndrome de Down a permis de mettre en relief la région DCR-1 sur le chromosome 21. Parmi les 20 gènes présents dans cette région, le gène *DYRK1A* constitue un bon gène candidat dans l'apparition du retard mental. Il code une protéine kinase tyrosine-sérine/thréonine qui appartient à la famille des DYRK ou « Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase », cette enzyme catalyse la phosphorylation de protéines cibles sur une sérine ou une thréonine, comme des facteurs de transcription, des protéines d'épissage et des protéines synaptiques.

Afin de comprendre le rôle et la régulation de DYRK1A dans le développement normal et pathologique et d'analyser l'effet gène/dosage de DYRK1A, il est essentiel d'avoir à sa disposition un test d'activité robuste de l'enzyme. Pour cela, je me suis tout d'abord appliquée à produire des protéines recombinantes. Les conditions de production étant optimisées, nous avons cherché à mettre en place une nouvelle méthode de dosage de l'activité kinase de DYRK1A. Les méthodes de dosage existantes jusqu'alors et qui ont permis de découvrir certaines propriétés de DYRK1A, utilisaient la radioactivité, la polarisation de fluorescente (FP), le transfert d'énergie par résonance de type Förster (TR-FRET) ou la méthode de l'ELISA. Pour différentes raisons, les méthodes actuelles ne se sont pas révélées idéales et nous avons dû mettre au point une nouvelle méthode de dosage utilisant la chromatographie à haute pression (HPLC). Le principe en est de séparer le peptide substrat (non phosphorylé) du peptide produit (phosphorylé), la plupart des tests actuels ne s'intéressent qu'au couple substrat/produit ATP/ADP ou GTP/GDP. Pour augmenter la sensibilité du dosage, nous avons greffé sur le peptide un Tag (ou étiquette) fluorescente. Cette méthode de dosage s'est révélée très rapide, peu onéreuse et très sensible.

La suite de ce travail fut donc de confirmer les données existantes sur l'activité DYRK1A en utilisant notre nouvelle méthode de dosage. L'activité kinase a tout d'abord été testée *in vitro* avec la protéine recombinante et les résultats obtenus confirment la nature Michaélienne de la cinétique de l'enzyme. Nous avons également caractérisé le comportement d'inhibiteurs connus de DYRK1A (notamment avec l'harmine) et les résultats obtenus sont tout à fait en adéquation avec la littérature. En collaboration avec l'équipe du Dr. Dodd nous avons criblés des dérivés hétérocycliques azotés de faible poids moléculaire comme inhibiteurs potentiels de DYRK1a. Le test d'activité a également été testé *in vivo* sur des extraits de cerveau de souris.

Ces résultats nous indiquent que ce nouveau test de dosage d'activité est spécifique, qu'il est reproductible et rapide. Le principe de ce test peut s'appliquer bien évidemment à d'autres kinases et phosphatases et plus largement à d'autres enzymes catalysant la réaction de modification de protéines (acétylation, méthylation ...).

Régulations épigénétiques de l'expression du gène codant ISL1, un facteur essentiel à la différenciation du lignage gonadotrope et à l'expression du récepteur de la GnRH.

La fonction de reproduction est contrôlée par le système nerveux central *via* le complexe hypothalamo-hypophysaire. Au sein de ce complexe, la GnRH, neurohormone d'origine hypothalamique, en activant son récepteur (GnRHR) spécifiquement exprimé à la surface des cellules gonadotropes de l'hypophyse, régule la synthèse et la sécrétion des deux hormones LH et FSH. Ces deux hormones hypophysaires, à leur tour, via la circulation générale, agissent sur les gonades et régulent la synthèse des stéroïdes sexuels, la maturation des gamètes et le cycle ovarien chez la femelle. L'hypophyse antérieure dérive de l'ectoderme oral et comporte 5 autres types cellulaires endocrines, les cellules lactotropes, somatotropes, corticotropes, thyrotropes et mélanotropes. La mise en place de l'hypophyse et du complexe hypothalamo-hypophysaire au cours du développement embryonnaire exige l'intervention de signaux extra-hypophysaires précoces et transitoires appartenant à la famille des BMP et des FGF. Ces signaux induisent l'expression transitoire ou permanente de facteurs hypophysaires autonomes comme les protéines LIM à homéodomaines (LIM-HD) ISL1 et LHX3, ou des facteurs comme GATA2 et PIT1. L'expression du gène du récepteur de la GnRH (*Gnrhr*) est restreinte aux seules cellules gonadotropes par le biais d'un code transcriptionnel impliquant plusieurs facteurs dont le facteur stéroïdogénique SF1 et l'hétérodimère formé par LHX3 et ISL1. Ces protéines LIM-HD seraient ainsi essentielles non seulement dans les étapes précoces du développement hypophysaire, dès E8.5-E9 chez la souris, mais aussi dans les étapes plus tardives de la différenciation du lignage gonadotrope, de E13.5 à E17.5 et dans le maintien du phénotype différencié chez l'adulte.

D'après les données obtenues au laboratoire par des expériences de ChIP on Chip, *Isl1* serait la cible de FOXL2, un facteur de transcription de la famille Forkhead. Mon projet initial visait à décrire et à préciser les interactions entre ces deux facteurs, avec l'hypothèse que ce mécanisme permettrait le maintien tardif de l'expression d'*Isl1* au cours du développement et chez l'adulte. J'ai donc entrepris de démontrer cette interaction par une première approche en transfection transitoire combinant le promoteur de 5 kb d'*Isl1* avec un vecteur d'expression pour FOXL2 et en utilisant diverses lignées cellulaires : gonadotropes (α T3-1 et L β T2), lacto-somatotrope (GH3B6), corticotrope (AtT20) hypothalamique (GT1-7) et neuronale (PC12). Aucun effet de FOXL2 n'a pu être décelé suggérant l'existence d'un ou de plusieurs partenaires inconnus qui seraient nécessaire à l'action de FOXL2. Toutefois, de façon inattendue et surprenante, une activité élevée du promoteur d'*Isl1* a été détectée dans toutes les lignées cellulaires testées alors qu'un petit nombre seulement de ces lignées, gonadotropes et hypothalamique, exprime les ARN messagers ou la protéine ISL1. Ces données suggéraient que le gène endogène codant pour ISL1 était soumis à des mécanismes de régulation épigénétiques auxquels échapperait le promoteur transfecté. Ces mécanismes provoqueraient la formation d'une structure chromatinienne ouverte ou fermée et donc l'activation ou la répression de la transcription d'*Isl1* suivant les lignées considérées. J'ai donc entrepris de déterminer et d'étudier la nature de ces régulations épigénétiques en utilisant ces modèles de lignées cellulaires, favorisant l'analyse des marques d'activités et d'inactivités des histones et l'analyse des profils de méthylation de l'ADN sur le promoteur d'*Isl1*. La triméthylation sur la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4Me3), l'acétylation sur les lysines 9 et 14 de l'histone H3 et l'acétylation sur la lysine 14 de l'histone H3 constituent les marques d'activités analysées dans cette étude : ces marques, par des mécanismes différents et complexes, favorisent l'ouverture de la structure chromatinienne et donc l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription. La présence de l'ARN polymérase II au niveau du site d'initiation de la transcription, testée avec un anti-PolIII-S5-phosphorylée, est un bon indicateur de l'activité transcriptionnelle. En revanche, la triméthylation sur la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27Me3) est une marque d'inactivité transcriptionnelle corrélée avec une structure chromatinienne fermée. J'ai ainsi utilisé différents anticorps capables de reconnaître ces différentes modifications en immunoprécipitation de chromatine : anti-acetyl-histone H3K9K14 et anti-acetyl-histone H3K14, anti-methyl-histone H3K4 et anti-methyl-histone H3K27. Ces études ont été réalisées par PCR semi-quantitative et quantitative en temps réel en utilisant comme matrice l'ADN isolé des différentes immunoprécipitations et des amorces spécifiques ciblant plusieurs promoteurs : *Isl1*, *Gnrhr*, *Cga*, *Fshb*, *Lhb*, *Hprt*, *POMC* et *Prl*. Je n'ai pas observé de corrélation évidente entre acétylations des histones et expression des gènes ni de corrélation entre les deux anticorps anti-acetyl-histone H3K9K14 et anti-acetyl-

histone H3K14. En revanche, j'ai pu mettre en évidence une corrélation claire entre la marque d'activité H3K4Me3 et l'expression des gènes. Inversement, la marque d'inactivité H3K27Me3 s'est révélée corrélée avec la répression de l'expression des gènes. Dans un deuxième temps, j'ai étudié le profil de méthylation de l'ADN du promoteur d'*Isl1* en utilisant les enzymes de restriction HpaII et MspI capables de discriminer les CpG méthylés des CpG non méthylés au niveau des motifs CCGG. Cette première analyse indique que dans les lignées exprimant *Isl1* (lignées α T3-1, L β T2 et GT1-7) le promoteur est non méthylé sur la région la plus proximale et partiellement méthylé au-delà. En revanche, dans les deux lignées qui n'expriment pas *Isl1*, la méthylation recouvre complètement le promoteur, incluant l'îlot CpG (lignée GH3B6) ou l'excluant (lignée AtT20). Ces données sont corrélées avec la présence des marques d'activité et d'inactivité de la chromatine.

En conclusion, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'expression d'*Isl1* est vraisemblablement activée par des facteurs de transcription ubiquistes, notamment de type SP1, le promoteur d'*Isl1* comportant plusieurs sites potentiels pour ce facteur. Ce mécanisme serait efficace lorsque le promoteur se trouve dans une structure chromatinienne ouverte ou lorsqu'il se situe en dehors de la structure chromatinienne (promoteur transfecté), laissant à ces facteurs de transcription libre accès à leur élément de réponse. Un tel processus pourrait s'établir physiologiquement dans les stades précoces du développement embryonnaire à 8,5 jours (E8.5) chez la souris lorsqu'*Isl1* s'exprime de façon ubiquiste dans toutes les cellules progénitrices de la future hypophyse ou poche de Rathke. Un peu plus tard, entre E9.5 et E11, l'expression d'*Isl1* est progressivement restreinte aux cellules situées dans la partie ventrale de l'hypophyse en développement par un gradient dorso-ventral de FGF. L'activation des récepteurs aux FGF induirait une fermeture de la chromatine au locus d'*Isl1* avec la mise en place des marques d'inactivité H3K27Me3 accompagnée de la méthylation de certains sites CpG, comme ceci est observé dans les lignées lacto-somatotrope et corticotrope, représentatives des cellules se différenciant dans la partie dorsale de l'hypophyse. En revanche, dans la partie ventrale, l'activation des récepteurs aux BMPs, induite par un gradient ventrodorsal de BMP2, maintiendrait l'expression d'*Isl1* au sein d'une structure chromatinienne ouverte par le positionnement des marques d'activité H3K4Me3. Ces mécanismes persisteraient chez l'animal adulte et permettraient, entre autres, l'expression ciblée et spécifique d'*Isl1* dans les cellules gonadotropes hypophysaires.

Sommaire

RESUME	3
1 LISTE DES ABREVIATIONS	10
2 LISTES DES FIGURES	13
2.1 DYRK1A.....	13
2.2 ISL1	14
 MISE AU POINT D'UN DOSAGE DE L'ACTIVITE KINASE DE LA PROTEINE DYRK1A : UN CANDIDAT POUR LE RETARD MENTAL ET LA DEGENERESCENCE DANS LE SYNDROME DE DOWN.	17
 1 INTRODUCTION GENERALE.....	17
LE SYNDROME DE DOWN OU TRISOMIE 21.....	17
1.1 UN PEU D'HISTOIRE : DU CONCEPT DE « L'IDIOTIE » A LA DEFINITION MEME DE LA TRISOMIE 21.	17
1.2 EPIDEMIOLOGIE, PHENOTYPES ET PATHOLOGIES ASSOCIEES.	18
1.2.1 Epidémiologie et étiologie de la Trisomie 21.....	18
1.2.2 Phénotypes et pathologies associées.....	20
1.2.3 Le QI et les malformations cranio-faciales.....	22
1.2.4 Le vieillissement et la maladie d'Alzheimer.....	23
1.3 LE CHROMOSOME 21	24
1.3.1 Sa structure	24
1.3.2 Gènes candidats ? Pourquoi pas !	28
1.3.3 Les modèles d'études murins.....	28
1.3.3.1 Trisomies partielles pour un grand nombre de gènes murins.....	30
1.3.3.2 Souris transgéniques par insertion de YACs (contenant un ou plusieurs gènes humains)	30
1.3.3.3 Les modèles monogéniques.....	31
 PROTEINE DYRK1A : CANDIDAT POUR LE RETARD MENTAL ET LA DEGENERESCENCE DANS LE SYNDROME DE DOWN	32
1.1 LES KINASES	33
1.1.1 Généralités sur les kinases.....	33
1.1.2 Structures générales des kinases.....	35
1.1.3 Rôles dans le système nerveux.....	38
1.2 LA PROTEINE DYRK1A	39
1.2.1 Gène	39
1.2.2 Expression.....	40
1.2.3 Structure.....	42
1.2.4 Fonctions.....	46
1.2.5 Propriétés enzymatique	50
1.2.6 Régulation	51
1.3 TESTS D'ACTIVITE DE DYRK1A	53
1.3.1 Test radioactif	53
1.3.2 Test ELISA.....	54
1.3.3 Test IMAP™ (Molecular Devices).....	55
 LE PROJET : DEVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU TEST DYRK1A PAR HPLC/UFLC AFIN DE TESTER DE NOUVELLES MOLECULES A VISEES THERAPEUTIQUES	56
1.1 MISE AU POINT D'UN NOUVEAU TEST KINASE.....	56
1.2 TEST DE NOUVEAUX INHIBITEURS <i>IN VITRO</i> ET <i>EX VIVO</i>	56
2 MATERIELS ET METHODES.....	57
2.1 EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA DYRK1A DE RAT RECOMBINANTE	57
2.1.1 Sous clonage.....	57
2.1.2 Culture	58
2.1.3 Extraction, purification	58
2.1.4 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.....	59
2.1.5 Immunoélectrotransfert (Western-blot).....	60
2.2 HPLC.....	60

2.2.1	Principe de l'HPLC.....	60
2.2.2	Analyses qualitatives.....	61
2.2.3	Analyses quantitatives.....	61
2.2.4	Le matériel.....	61
2.2.5	Les colonnes.....	62
2.3	PROTOCOLE DE DOSAGE PAR HPLC.....	63
2.3.1	Dosage de l'activité.....	63
2.3.2	Méthode HPLC.....	63
2.4	INHIBITION DE L'ACTIVITE DYRK1A.....	64
2.4.1	Protocole.....	64
2.4.2	Modèle mathématiques.....	64
3	RESULTATS.....	66
3.1	PRODUCTION DES ENZYMES RECOMBINANTES.....	66
3.1.1	Sous clonage.....	66
3.1.2	Culture et extraction.....	66
3.2	TEST D'ACTIVITE DE DYRK1A.....	69
3.2.1	Mise au point.....	69
3.2.1.1	Gamme étalon substrat peptide.....	69
3.2.1.2	Détermination des vitesses initiales (v_i).....	70
3.2.2	Détermination des paramètres cinétiques apparents.....	71
3.2.2.1	Mesure de v_i en fonction de la concentration d'enzyme.....	72
3.2.2.2	Mesure de v_i en fonction de la concentration en substrat.....	73
3.3	INHIBITION DE DYRK1A.....	75
3.3.1	L'Harmine.....	75
3.3.2	Criblage d'inhibiteurs.....	78
3.4	TESTS <i>IN VIVO</i> DE L'ACTIVITE ENDOGENE DYRK1A.....	80
3.4.1	Mise au point du dosage.....	80
3.4.2	Tests des inhibiteurs dans un contexte cellulaire.....	81
4	DISCUSSION GENERALE, CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIFS.....	83
5	BIBLIOGRAPHIE.....	90

REGULATIONS EPIGENETIQUES DE L'EXPRESSION DU GENE CODANT ISL1, UN FACTEUR ESSENTIEL A LA DIFFERENCIATION DU LIGNAGE GONADOTROPE ET A L'EXPRESSION DU RECEPTEUR DE LA GNRH.104

1	INTRODUCTION GENERALE.....	104
1.1	LE COMPLEXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSAIRE.....	105
1.1.1	Anatomie fonctionnelle de l'hypophyse.....	107
1.1.2	Mise en évidence du contrôle neuro-hormonal.....	108
1.1.3	Découverte des neurohormones hypothalamiques.....	109
1.1.4	L'hypophyse, une invention évolutive des Vertébrés.....	110
1.2	LA GNRH.....	114
1.2.1	Les neurones à GnRH.....	114
1.2.2	La pulsativité de la GnRH et ses conséquences.....	115
1.2.3	Les régulations de la GnRH.....	116
1.3	LE RECEPTEUR DE LA GNRH (GNRHR).....	117
1.3.1	Séquence et structure du GNRHR.....	117
1.3.2	Les voies de signalisation couplées au récepteur de la GnRH.....	119
1.3.3	La mise en évidence de la présence du GNRHR extra-hypophysaire.....	121
1.3.3.1	Le système GnRH/GNRHR dans les tissus sains et tumoraux.....	121
1.4	LE GENE DU RECEPTEUR DE LA GNRH.....	122
1.4.1	Structure générale du gène humain et des rongeurs.....	122
1.4.2	Les promoteurs du Gnhr.....	122
1.4.3	ISL1 et LHX3, des protéines LIM-HD essentielles à l'expression du Gnhr.....	123
1.5	ISL1, UNE PROTEINE LIM A HOMEODOMAINE PARMI D'AUTRES ?.....	124
1.5.1	Les protéines LIM.....	127
1.5.2	Les protéines LIM à homéodomaine (LIM-HD).....	128
1.5.3	ISL1 est impliquée dans plusieurs processus développementaux.....	132
1.5.3.1	Les interactions moléculaires à la base du "code LIM".....	132
1.5.3.2	Les divers rôles d'ISL1 dans le développement chez les Mammifères.....	135

1.6	LES MECANISMES GENETIQUES ET EPIGENETIQUES POTENTIELLEMENT IMPLIQUES DANS L'EXPRESSION DES GENES	142
1.6.1	<i>Modifications épigénétiques</i>	142
1.6.1.1	Modifications des histones	142
1.6.1.2	Modification de l'ADN	145
1.7	LES OUTILS UTILISES	148
1.7.1	<i>Les lignées cellulaires</i>	148
1.7.1.1	Les cellules GT1-7	148
1.7.1.2	Les cellules α T3-1	149
1.7.1.3	Les cellules L β T2	149
1.7.1.4	Les cellules GH3B6.....	150
1.7.1.5	Les cellules AtT20.....	150
1.8	OBJECTIFS	151
2	MATERIELS ET METHODES.....	152
2.1	LES ANTICORPS	152
2.2	CULTURE CELLULAIRE	152
2.3	ETUDES DE L'ACTIVITE DU PROMOTEUR : ENZYMES DE RESTRICTION ET CONSTRUCTIONS.....	152
2.4	TRANSFECTION TRANSITOIRE.....	156
2.5	EXTRACTION DE PROTEINES NUCLEAIRES ET WESTERN BLOT	157
2.5.1	<i>Extractions nucléaires des cellules en culture</i>	157
2.5.2	<i>Les westerns blot</i>	157
2.6	IMMUNOPRECIPITATION DE CHROMATINE (CHIP)	158
2.6.1	<i>Le Cross-linking</i>	158
2.6.2	<i>L'extraction des noyaux</i>	159
2.6.3	<i>L'immunoprécipitation</i>	159
2.6.4	<i>Le lavage des billes</i>	161
2.6.5	<i>Extractions des ADN</i>	162
2.7	ANALYSES DE LA METHYLATION.....	162
2.7.1	<i>Les PCR semi-quantitatives</i>	162
2.7.2	<i>La PCR en temps réel</i>	164
2.7.3	<i>Détermination des intensités de fluorescence</i>	164
2.7.3.1	Par PCR semi-quantitative.....	164
2.7.3.2	Par PCR quantitative en temps réel	165
2.8	EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE	165
2.9	IMMUNOHISTOLOGIE	166
3	RESULTATS	168
3.1	DETERMINATION DU SITE D'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION DU GENE <i>Isl1</i>	168
3.2	ETUDE DE L'ACTIVITE DU PROMOTEUR.	173
3.2.1	<i>Activité ubiquiste du promoteur d'Isl1 dans différentes lignées cellulaires</i>	173
3.2.2	<i>Etude par immunohistochimie de la localisation de FOXL2 dans l'hypophyse.</i>	174
3.2.3	<i>Étude du promoteur du gène Isl1 par « délétion » de différents fragments en présence ou en absence de FOXL2</i>	175
3.3	ANALYSE DE L'EXPRESSION DU GENE ENDOGENE CODANT ISL1	179
3.4	MODIFICATIONS EPIGENETIQUES D'ISL1 DANS LES DIFFERENTES LIGNEES HYPOPHYSAIRES...183	
3.4.1	<i>Etudes comparées des promoteurs</i>	183
3.4.2	<i>Modifications des histones</i>	186
3.4.2.1	Analyses des gènes ubiquiste et non gonadotropes.....	186
3.4.2.2	Analyse des gènes potentiellement exprimés dans les cellules gonadotropes.....	191
3.4.3	<i>Analyse de l'état de méthylation dans les différentes lignées</i>	200
4	DISCUSSION ET CONCLUSIONS	208
4.1	L'ACTIVITE DU PROMOTEUR D'ISL1 EST SOUS LA DEPENDANCE DE FACTEURS DE TRANSCRIPTION	208
4.1.1	<i>Éléments régulateurs présents sur le promoteur d'Isl1 de 5kb</i>	210
4.1.2	<i>Éléments régulateurs présents au locus d'Isl1</i>	210
4.2	ROLES DES REGULATIONS EPIGENETIQUES DANS L'EXPRESSION D' <i>ISL1</i>	213
4.2.1	<i>Structure des promoteurs</i>	213
4.2.2	<i>Modifications des histones</i>	215
4.2.2.1	L'expression d'Isl1 et celle du Gnhr sont essentiellement corrélées avec les marques K4Me3 et K27Me3.....	216
4.2.2.2	Rôles des marqueurs, effaceurs et effecteurs des modifications d'histones	218

4.2.3	<i>La diversité des complexes répresseurs et activateurs implique une diversité des régulations.....</i>	<i>221</i>
4.2.3.1	Couplage moléculaire entre méthylation de l'ADN et des histones.	222
4.2.3.2	Les conséquences des régulations épigénétiques.....	224
5	CONCLUSION GENERALE	226
6	BIBLIOGRAPHIE	229

1 Liste des abréviations

21q	bras long du chromosome 21	DSCAM	Down-Syndrome-Cell-Adhesion-Molecule
5HT	Sérotonine	DSCR	Down-Syndrome-Critical-Region
ACTH	Adrenocorticotrop Hormone	DSK	Dual-Specificity Kinase
AD	Alzheimer Disease	DYRK	Dual-Specificity-Tyrosine phosphorylation-Regulated Kinase
ADD	ATR-X-DNMT3-DNMT3L	DYRK1A	Dual-specificity-Tyrosine-phosphorylation-Regulated Kinase 1A
ADN	Acide Désoxyribonucléique		
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire	E	Jour de développement embryonnaire
AKT (PKB)	Protein Kinase B	eIF2β	Eukaryotic Initiation Factor 2β
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic-acid receptor	ePK	Eukaryotic Protein Kinase
AMPc	Adénosine-Monophosphate cyclique	ER	Estrogen Receptor
AP1	Activator Protein 1	ERK	Extracellular-signal-Regulated Kinase
APP	Amyloid Precursor Protein		
ARNm	Acide Ribonucléique messenger	FGF	fibroblast growth factor
ATD	Actin-Target Domain	FKHR	(FOXO1a) Forkhead in Human Rhabdomyosarcoma
ATP	Adenosine Triphosphate	FOXL2	Forkhead box protein L2
AtT20	Lignée tumorale adénohypophysaires	FSH	Follicle-Stimulating Hormone
BAC	Bacterial-Artificial Chromosome	GABA	acide γ-aminobutyrique
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor	GAP	GnRH-Associated Protein
BMP	Bone Morphogenetic Protein	GFAP	Glial fibrillary acidic protein
bZIP	basic leucine Zipper domain	GH	growth hormone
		GH3B6	lignée somatolactotrope de rat
CaMK	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase	GLI1	Glioma-Associated oncogene homolog 1
CaN	Calcineurine	GMPc	Guanosine Monophosphate cyclique
CDK	Cyclin-Dependent Kinase	GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormone
ChIP	Chromatin-Immuno-Precipitation	GnRHR	Gonadoliberine Receptor
CHO	Lignée ovarienne: Chinese Hamster Ovary	GnSE	Gnrhr Specific Enhancer
CK2	cyclin kinase 2	GSK	Glycogen-Synthase Kinase
CLIM	Cofactor LIM	GST	Glutathione S-Transferase
CMGC	(Groupe) CDK-MAPK-GSK-CDK like Kinase	GT1-7	Lignée immortalisée de neurones à GnRH murins
COS	Lignée rénale d'origine simienne (CV-1) transformée par SV40	GTP	Guanosine Triphosphate
CRE	cAMP Response Element		
CREB	CRE-Binding protein	H	Histone
CREST	Conserved-Regulatory Element of the Isl1 gene	HAT	Histone Acetyltransferase
CRH	Corticotrophin-Releasing Hormone	HDM	Histone Demethylase
CXXC	Cys-X-X-Cys	HMT	Histone Methyltransferase
DCR-1	Down-Syndrome-Critical-Region 1	HPRT	Hypoxanthine Phosphosyl Transferase
déP*	déphosphorylé		
DNF	Dégénérescence Neurofibrillaire		
DNMT	DNA Methyltransferase		

IL-6	Interleukine 6	PC12	Lignée cellulaire d'un phéochromocytome de rat
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique	PcG	Polycomb group
ISL1	Insulin gene enhancer protein 1	PCLβ	Phospholipase Cβ
		PCR	Polymerase Chain Reaction
		PDZ	PSD-97 discs-large-ZO-1
		PETscan	Positron-Emission-Tomography scanner
JAK	Janus Kinase	PKA/PKC	Protein Kinase A/C
		P-LIRE	Proximal LIM Response Element
kb	kilo base	POMC	Pro-Opiomelanocortine (Domaine) PIT-OCT-UNC
		POU	Poche de Rathke
LD	Leucine-aspartate Domain	PR	Prolactine
LDB	LIM domain-binding protein	PRL	Protéine Tau Phosphorylée
LH	lutinizing hormone	PTP*	Pentylentetrazole
LHX	LIM homéodomaine protein	PTZ	
LID	LIM interaction domain		
LIM	(Domaine) Lin11-Isl1-Mec3	QI	quotient intellectuel
LIM-HD	(Protéine) LIM à Homéodomaine		
LMO	LIM Only	RCAN1	Regulator of Calcineurin1
LTD	Long-Term Depression	RGC5	Lignée de cellules ganglionnaires rétiniennes
LTP	Long-Term Potentiation	RMN	résonance magnétique nucléaire
LβT2	Lignée gonadotrope murine	RNA Pol II	RNA Polymerase II
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase	SAP	SF1 adjacente protein
MBD	Methyl-CpG-Binding Domain	SD	semaine de développement
MEK	MAPK/ERK Kinase	SET	Su(Var)3-9 enhancer of Zeste
Mg²⁺	Magnesium		Trithorax
MLL	Mixed Lineage Leukemia	SF1	facteur stéroïdogénique 1
mLTC1	Lignée tumorale de cellules de Leydig murine	SHF	second heart field
MMU	Mouse Chromosome	Shh	Sonic-hedgehog
Mn²⁺	Manganese	siRNA	Petits ARN interférants (Small Interfering RNA)
MNB	Minibrain		selective LIM binding protein
MSH	Melanocortin-Stimulating Hormone	SLB	Superoxyde Dismutase
		SOD	supraoptic nucleus
		SON	somatotropin-released-inhibiting factor
NEUROM	Neuron motor protein	SRIF	Serine/threonine-Protein Kinase
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells	SRPK	start site of transcription
NGF	Neural Growth Factor	SST	Signal Transducer and Activator of Transcription
NLI	Nuclear LIM Interactor 1	STAT	Simian Virus 40
NLS	Nuclear Localization Signal	SV40	Tomographie par Emission de Positons après injection de ¹⁸ F-Fluoro-2-Déoxy-Glucose
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartate Receptor	TEP-FDG	Transgénique
NO	Monoxide d'azote		Thyrotropin-Releasing Hormone / Factor
NOS-1	NO Synthase neuronal	Tg	Trithorax Group
		TRH/TRF	Thyroid-Stimulating Hormone
OCT	Octamer-binding Transcription factor	TrxG	
		TSH	
P*	Phosphorylation		
P53	Tumor Protein 53	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
PA	Protéine Amyloïde		
pb	paires de base		

VIP	Vasoactive Intestinal Peptide
VPN	Ventral Posterior Nucleus
YAC	Yeast Artificial Chromosome
αGSU (CGA)	Sous-unité Alpha des hormones glycoprotéiques (LH, FSH, TSH)
αMSH	Sous-unité Alpha de la MSH
αT3-1	Lignée gonadotrope murine
γP	Gamma-Phosphate

2 Listes des figures

2.1 DYRK1A

- Figure 1a** Caryotype d'une femme atteinte d'une trisomie 21 libre, 47, XX, +21.
1b Caryotype d'une femme atteinte d'une trisomie 21 par translocation robertsonnienne 45, XXder(21t)(14q ; 21q) (**page 19**)
- Figure 2** Régions synténiques entre le chromosome 21 humain et les chromosomes de souris (MMU) 10, 16 et 17 (**page 26**)
- Figure 3** La région DCR-1 « Down Syndrome Chromosomal Region-1 » (**page 27**)
- Figure 4** Les différents modèles d'études murins sur le Syndrome de Down (**page 29**)
- Figure 5** Structure tridimensionnelle d'une protéine kinase de la famille des ePK et de son domaine catalytique (**page 36**)
- Figure 6** Structure générale d'une protéine kinase obtenu par modélisation moléculaire (**page 37**)
- Figure 7** Structure tridimensionnelle du lobe C et des épines C et R d'une protéine kinase de la famille des ePK (**page 37**)
- Figure 8** La protéine DYRK1A (**page 43**)
- Figure 9** Structure linéaire de la protéine DYRK1A (**page 44**)
- Figure 10a/b** Les protéines cibles de DYRK1A et ses fonctions (**page 47**)
- Figure 11** Schéma de la réaction catalysée par Dyrk1A (**page 50**)
- Figure 12** Site d'autophosphorylation de Dyrk1A (**page 52**)
- Figure 13** Les protéines recombinantes obtenues (**page 57**)
- Figure 14** Inhibition compétitive (**page 64**)
- Figure 15** Inhibition non compétitive (**page 65**)
- Figure 16** Purifications des protéines recombinantes (**page 67**)
- Figure 17** Vérification de la qualité des protéines recombinantes (**page 68**)
- Figure 18** Chromatogramme du FAM-peptide en détection par fluorescence (**page 69**)
- Figure 19** Gamme étalon du substrat FAM-peptide (**page 70**)
- Figure 20** Analyse UFLC et cinétique de phosphorylation du peptide substrat par His-DYRK1A-ΔC (**page 71**)
- Figure 21** Représentation d'Ackermann Potter (**page 72**)
- Figure 22** Représentation de Michaelis-Menten (**page 74**)
- Figure 23** Inhibition de l'activité DYRK1A par l'Harmin (**page 76**)
- Figure 24** Cinétiques d'inhibition de l'Harmin sur l'activité DYRK1A (**page 77**)

- Figure 25** Inhibition de l'activité DYRK1A par les molécules synthétisées par l'équipe de R Dodd (**page 78**)
- Figure 26** Mesure de l'activité endogène de DYRK1A (**page 81**)
- Figure 27** Inhibition de l'activité DYRK1A endogène par les molécules synthétisées par l'équipe de R Dodd (**page 82**)
- Figure 28a/b/c** Inhibiteurs potentiels de DYRK1A (**page 87**)

2.2 ISL1

- Figure 1** L'axe hypothalamo-hypophysaire chez les Mammifères (**page 106**)
- Figure 2** L'axe gonadotrope chez les Mammifères (**page 113**)
- Figure 3** Structure du gène d'ISL1 mammalien (**page 126**)
- Figure 4** Cladogramme des facteurs LIM chez la souris (**page 130**)
- Figure 5** Facteurs LIM à homéodomaine (ISL1 et LHX3) (**page 131**)
- Figure 6** Le code LIM transcriptionnel dans la moelle épinière (**page 134**)
- Figure 7** Les modifications épigénétiques des histones et de l'ADN (**page 147**)
- Figure 8** Détermination du site d'initiation de la transcription du gène *Isl1* (**page 171**)
- Figure 9** Ilot CpG au niveau du promoteur du gène *ISL1* humain (**page 172**)
- Figure 10** Activité ubiquiste du promoteur d'*Isl1* dans différentes lignées cellulaires (**page 176**)
- Figure 11** Etude par immunohistochimie de la localisation nucléaire de FOXL2 dans l'adénohypophyse (**page 177**)
- Figure 12** Étude du promoteur du gène *Isl1* par « délétion » de différents fragments en présence ou en absence de FOXL2 dans les cellules gonadotropes α T3-1 (**page 178**)
- Figure 13** Analyse de l'expression du gène endogène codant la protéine ISL1 et GnRHR par qPCR en temps réel (**page 181**)
- Figure 14** Étude par Western blot de la protéine ISL1 dans les lignées cellulaires (**page 182**)
- Figure 15** Étude comparée des promoteurs des gènes *Lhb*, *Fshb*, *Cga*, *Gnrhr*, *Prl*, *POMC*, *Isl1* et *Hprt* (**page 185**)
- Figure 16** Analyse des marques de modification des histones sur le gène *Hprt* (**page 188**)
- Figure 17** Analyse des marques de modification des histones sur le gène *Prl* dans la lignée lactosomatotrope GH3B6 (**page 189**)
- Figure 18** Analyse des marques de modification des histones sur le gène *POMC* dans la lignée corticotrope AtT20 (**page 190**)
- Figure 19** Analyse des marques de modification des histones sur le gène *Isl1* (**page 195**)

Figure 20	Analyse des marques de modification des histones sur le gène <i>Gnrhr</i> (page 196)
Figure 21	Analyse des marques de modification des histones sur le gène <i>αGsu</i> (page 197)
Figure 22	Analyse des marques de modification des histones sur le gène <i>Lhβ</i> (page 198)
Figure 23	Analyse des marques de modification des histones sur le gène <i>Fshβ</i> (page 199)
Figure 24	Étude <i>in silico</i> des sites CpG du gène <i>Isl1</i> chez la souris (page 202)
Figure 25	Étude de la méthylation du promoteur <i>d'Isl1</i> par digestion enzymatique HpaII et MspI des ADN génomiques des lignées LβT2, αT3-1 et GT1-7 (page 205)
Figure 26	Étude de la méthylation du promoteur <i>d'Isl1</i> par digestion enzymatique HpaII et MspI des ADN génomiques des lignées AtT20 et GH3B6 (page 206)
Figure 27	Profils de méthylation du promoteur d' <i>Isl1</i> dans les différentes lignées analysées (page 207)

Partie 1

**Mise au point d'un dosage de l'activité kinase
de la protéine DYRK1A : un candidat pour le
retard mental et la dégénérescence dans le
Syndrome de Down.**

Mise au point d'un dosage de l'activité kinase de la protéine DYRK1A : un candidat pour le retard mental et la dégénérescence dans le syndrome de down.

1 Introduction générale

Le Syndrome de Down ou Trisomie 21

1.1 Un peu d'histoire : du concept de « l'idiotie » à la définition même de la Trisomie 21.



En 1866 a été publiée une description phénotypique d'un syndrome par le Dr Down sans que celui-ci n'ait une idée précise de l'origine de cette maladie. Ce syndrome devenu le Syndrome de Down (SD) est une maladie chromosomique congénitale ayant pour cause première la présence d'un chromosome 21 surnuméraire. C'est en janvier 1959, que Jérôme Lejeune, Marthe Gautier et Raymond Turpin démontrèrent l'origine chromosomique du SD (Lejeune et al, 1959a et b). A la même époque, une équipe américaine dirigée par Patricia Jacobs abouti à la même conclusion (Jacobs et al, 1959 et 1995). Ces découvertes permirent de déterminer la cause de « l'idiotie mongoloïde » ou SD, et Jérôme Lejeune proposa alors d'appeler cette pathologie la Trisomie 21, « tri » pour trois et « somie » pour pathologie concernant les chromosomes. C'est la première anomalie génétique décrite et identifiée chez l'Homme et la première pathologie pour laquelle la relation entre le génotype et le phénotype était mise en évidence.

1.2 Epidémiologie, phénotypes et pathologies associées.

1.2.1 Epidémiologie et étiologie de la Trisomie 21.

La trisomie 21 est l'aneuploïdie la plus courante. Une méta-analyse compilant toutes les données obtenues à partir des onze systèmes de surveillance de naissances américaines entre 1999 et 2001 (Canfield et al, 2006), a déterminé la prévalence du SD à un cas pour 732 naissances. Une étude plus récente, s'appuyant sur les données de dix régions américaines, montre une incidence de 1/800 pour toutes grossesses et une prévalence de 11,8/10 000 naissances pour l'année 2003 (Shin et al, 2009). Pour compléter ces données, l'étude française réalisée sur la population parisienne entre 2001 et 2005 (Dr Catherine de Vigan et collaborateurs, 2007 ; http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/rapport_evaluation_des_strategies_de_depistage_de_la_trisomie_21.pdf) montre que la prévalence reste stable et est de 7,1/10 000 naissances. La prévalence varie en fonction de l'âge de la mère : lorsque celle-ci a 20 ans, elle est de 1/1500 naissances, 1/1000 naissances à 30 ans, de 1/100 à 40 ans, et de 1/28 à 50 ans.

La trisomie 21 se présente sous trois formes possibles (**Figure 1**). La très grande majorité des patients présente une trisomie libre, qui est causée par la présence d'un chromosome entier surnuméraire (95% des personnes atteintes, **Figure 1a**). Celui-ci est pour 95% des cas d'origine maternelle (Epstein et al, 2001 ; Galdzicki et al, 2001). Une autre forme de trisomie est la trisomie par translocation robertsonienne d'origine parentale (3 % des personnes atteintes, **Figure 1b**). Il y a fusion de deux chromosomes 21 par translocation sur le chromosome 14 ou 21. La formule chromosomique peut être 45, XYder(21)t(21q ;21q) ou 45,XXder(21)t(21q ;21q) ou lorsqu'il s'agit d'un translocation sur le chromosome 14 : 45, XYder(21)t(14 q;21q) ou 45,XXder(21)t(14q ;21q) (Rahmani et al, 1989). Et enfin 2% des cas de trisomie 21 sont des mosaïques cellulaires. Deux types de cellules sont alors observées : un des types cellulaires comporte le bon nombre de chromosome et l'autre possède trois chromosomes 21. Ces cas de trisomies sont d'origine mitotique et interviennent au cours de l'embryogénèse (Epstein et al, 2001).

Karyotype From a Female With Down Syndrome (47,XX,+21)

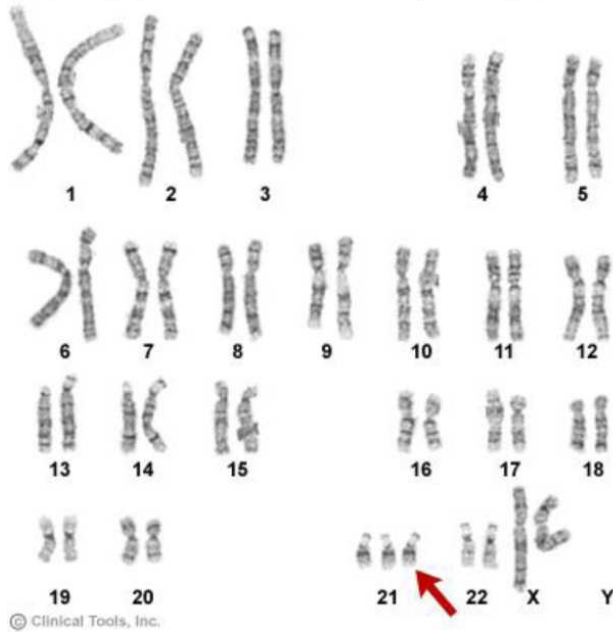


Figure 1a
Trisomie 21 libre

Caryotype d'une femme atteinte d'une trisomie 21 libre, 47, XX, +21.

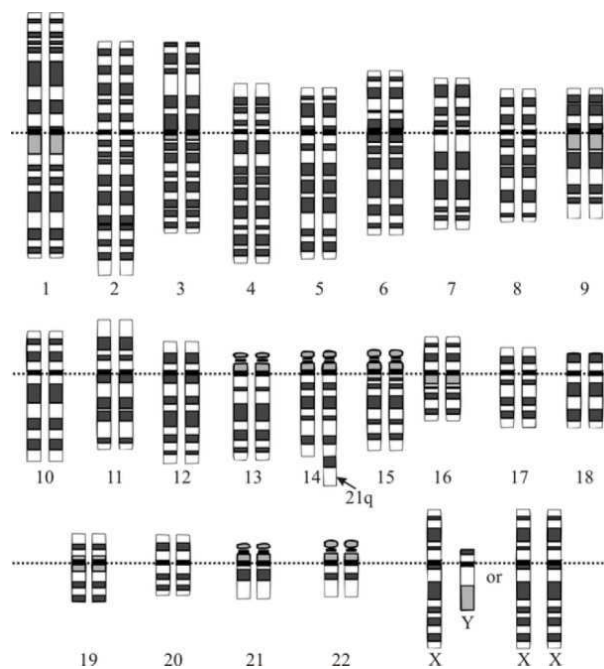


Figure 1b
Trisomie 21 par translocation

Caryotype d'une femme atteinte d'une trisomie 21 par translocation robertsonienne 45, XXder(21t)(14q ; 21q)

1.2.2 Phénotypes et pathologies associées.

En 1976, JF. Jackson publia un article dans lequel il rassemblait les descriptions phénotypiques issues des observations faites par le Pr Lejeune (Lee et Jackson, 1972 ; Jackson et al, 1976). Cette liste de signes phénotypiques fut ensuite affinée grâce à des techniques médicales plus précises (Dahmane et al, 1998 ; Epstein et al, 2001). Dans une étude récente (pour revue Dierssen et al, 2009) il a été mis en évidence que les variabilités phénotypiques observées sont en rapport direct avec les variabilités d'expression de gènes se situant sur le chromosome 21. Chaque individu atteint du SD présente une combinaison d'affections et de caractéristiques phénotypiques qui lui est propre (pour revue Antonarakis et Epstein, 2006). Les symptômes suivants représentent donc une énumération non exhaustive des malformations les plus couramment observées chez les personnes trisomiques.

Le visage est rond, large et aplati avec des joues rondes et latéralement étendues. Les yeux sont plus espacés l'un de l'autre, placés de manière oblique avec un repli cutané de l'angle interne des paupières ou épicanthus interne et une fissure palpébrale étroite. Le nez est aplati à son implantation, les oreilles sont basses et mal repliées, la langue est épaisse avec des fissures transversales et occasionne une gêne permanente chez les personnes trisomiques qui ont le réflexe de la pousser vers l'extérieure de la bouche (protrusion de la langue). La mâchoire est étroite. 90% des personnes concernées présentent une brachycéphalie, ce qui témoigne d'une malformation crânienne due à la soudure précoce de la suture coronale (Down, 1866 ; Epstein et al, 2001 ; Sureshbabu et al, 2011).

Les malformations cardiaques qui touchent environ la moitié des personnes trisomiques sont la première cause de mortalité. Parmi les anomalies les plus fréquentes il y a des anomalies du septum auriculo-ventriculaire, des anomalies des communications inter ventriculaires et inter auriculaires de type 2, ainsi que des anomalies aortiques. (Baptista et al, 2000 ; Barlow et al, 2001 ; Shinohara et al, 2001 ; pour revue Vis et al, 2009).

Les malformations du tube digestif touchent près de 15% des personnes. Elles se manifestent par un duodénum obstrué (Korenberg et al, 1992), des communications œsophagiennes et trachéennes anormales (pour revue Torfs et al, 1992 ; Bianca et al, 2002),

d'une sténose du pylore, d'un pancréas annulaire et d'une atrésie anale (Levy et al, 1991 ; pour revue Torfs et al, 1992).

Les dystrophies des membres et les anomalies musculaires et squelettiques sont également très fréquentes. Les membres supérieurs et inférieurs sont généralement plus courts (pour revue Hawli et al, 2009). Les mains sont petites, trapues, et présentent un pli palmaire unique et l'auriculaire montre une fréquente brachymésophalangie. Les pieds sont également plus petits avec un espace plus prononcé entre le gros orteil et le deuxième doigt du pied. Une clinodactylie peut être remarquée au niveau des orteils ou des doigts de la main (Korenberg et al, 1994 ; Sureshbabu et al, 2011). L'hypotonicité musculaire ainsi que l'hyperlaxité ligamentaire sont fréquentes et même caractéristiques des personnes trisomiques et favorisent l'apparition de scolioses, de luxations et d'instabilités articulaires. Cela affecte la motricité de ces personnes. La protrusion de la langue et de l'abdomen, mais aussi l'affaissement de la voûte plantaire sont des conséquences de l'hypotonicité musculaire. Ce qui va retarder l'apprentissage du langage, de la tenue de la tête, de la station assise et de la marche chez les enfants (pour revue Hawli et al, 2009).

Chez les enfants atteints du SD, la marche et le langage sont acquis tardivement, conséquences fréquentes de l'hypotonicité musculaire comme vu plus haut, mais également d'un dysfonctionnement plus ou moins prononcé du cerveau et des fonctions endocriennes (Epstein et al, 2001 ; pour revue Hawli et al, 2009). Le retard de croissance et la petite taille sont des traits communs à toutes les personnes trisomiques, caractérisés par un déficit significatif en hormone de croissance (GH) et en facteur IGF (Cronk et al, 1988 ; Anneren et al, 1990). D'autres hormones voient leurs régulations et leurs fonctions affectées, ce qui va engendrer divers troubles, tels qu'une hypothyroïdie congénitale (6% des cas) ou acquise (25% des cas) (Karlson et al, 1998 ; Unachak et al, 2008 ; pour revue Hawli et al, 2009). Des troubles de la reproduction, du développement des appareils reproducteurs et de la fertilité sont aussi des traits communs aux personnes trisomiques. Chez les femmes, il est observé de l'hypogonadisme accompagné d'un retard de sécrétion d'androgènes entre six et huit ans, ainsi que d'un retard voir une absence d'apparition du cycle menstruel (pour revue Hawli et al, 2009). Chez les hommes, une ambiguïté sexuelle peut survenir se manifestant par une rétractation du pénis, de petits testicules mais également par un retard voir une absence de la

spermatogénèse. Tout cela peut s'accompagner d'une augmentation significative du taux de LH et de FSH sanguins (Sakadamis et al, 2002 ; pour revue Hawli et al, 2009).

Les personnes atteintes du SD ont un retard mental plus ou moins prononcé. Celui-ci dépend de chaque personne. Il s'agit d'un trouble caractérisé par des dysfonctionnements de plusieurs fonctions cognitives, mais aussi par des malformations cérébrales et cranio-faciales. Ces dernières ainsi que l'environnement et les liens sociaux qu'entretiennent ces personnes avec leurs entourages joueront un grand rôle dans l'accentuation du déclin cognitif.

1.2.3 Le QI et les malformations cranio-faciales

Le Quotient Intellectuel ou QI est un facteur qui est mesuré et utilisé dans le cadre d'examens psychologiques chez les enfants trisomiques comme étant une indication quantitative standardisée liée à la capacité de reproduire ou non des tâches. Les résultats des tests de QI ne fournissent que de simples indications sur les capacités intellectuelles de la personne et sur les difficultés cognitives qui peuvent être rencontrées. Ces tests doivent être interprétés avec précaution. Poser des conclusions reposant uniquement sur des tests de QI est hasardeux et problématique sur le plan éthique. Ceci étant dit, des études (Wishart et al, 1993 ; pour revue Delabar et al, 2006) montrent, par l'utilisation de différentes échelles et tests, que le QI mesuré chez des enfants atteints du SD décline progressivement dès la première année de vie. D'autres études ont mis en évidence que ce QI variait entre 25 et 80 (pour revue Delabar et al, 2006), avec une moyenne située entre 44 et 55 (Vicari et al, 2004 ; pour revue Delabar et al, 2006). Pour expliquer ce déclin cognitif, une étude récente (pour revue Dierssen et al, 2009) a émis l'hypothèse qu'il existerait un lien entre les déficits cognitifs et les déficits linguistiques chez les personnes trisomiques. Selon des études cognitives incluant des études linguistiques, l'identification des mots et leurs intégrations visuelles ne sont pas déficitaires, en revanche, leur compréhension et l'intégration verbale le sont (pour revue Fidler et Nadel, 2007). Les personnes atteintes du SD ont, pour une très nette majorité, de grandes difficultés linguistiques. Cela se traduit par un discours le plus souvent aphasique et par l'utilisation limitée de mots de liaisons ou de pronoms (Vicari et al, 2004).

Les malformations cérébrales et cranio-faciales furent révélées par le biais d'études *post-mortem*, d'études d'électrophysiologies et d'études d'imagerie médicale par IRM. Elles

sont utilisées à l'appui des observations rendant compte des difficultés de mémorisation et d'apprentissage que rencontrent les personnes trisomiques. D'après les observations recueillies, il y a une diminution de près de 25% du poids et du volume du cerveau (pour revue Delabar et al, 2006). Les IRM d'enfants et d'adolescents montrent une diminution de 17% du volume total avec une répartition régionale de cette diminution qui varie de manière hétérogène. Le volume du cervelet est réduit de 30%, l'hippocampe, l'amygdale, les lobes temporaux et le lobe frontal présentent également une réduction de volume (Pinter et al, 2001a/b ; pour revue Lubec et al, 2002), alors que l'on observe une augmentation de la substance grise au niveau du cortex cérébrale et du cortex entorhinal de l'hippocampe (White et al, 2003 ; Teipel et al, 2004). S'associe à cela une diminution du nombre de neurones dans certaines régions du cerveau, en particulier le cervelet, l'hippocampe et le cortex frontal, un défaut de myélinisation des axones, une réduction de la taille des dendrites et du nombre des épines dendritiques (Wisniewski et al, 1990 ; Koo et al, 1992 ; Golden et al, 1994 ; Takashima et al, 1994 ; Guidi et al, 2008). Parmi les malformations cranio-faciales les plus courantes, la brachycéphalie est détectée chez près de 90% des personnes trisomiques (pour revue Delabar et al, 2006).

1.2.4 Le vieillissement et la maladie d'Alzheimer

Parler de vieillissement pour des enfants, des adolescentes et des jeunes adultes n'est pas naturel en soi. Mais le contexte génétique des personnes trisomiques est associé, par le biais de divers mécanismes, à une diminution de l'espérance de vie et l'apparition d'un vieillissement précoce. L'espérance de vie, qui en 1929, était de 9 ans, ne dépassait pas 25 ans en 1980. Elle est de plus de 55 ans aujourd'hui et environ 25% des personnes trisomiques dépasseront 60 ans (Glasson et al, 2002). Cette espérance de vie n'a cessé de croître depuis les dernières décennies grâce en particulier aux techniques médicales évoluant et permettant de prendre en charge bon nombres de pathologies associées à la trisomie 21.

Les signes de vieillissement précoce, fréquents chez les individus atteints de trisomie 21, affectent des organes très divers : le thymus, la peau, l'œil, le système endocrinien et le système nerveux central. Des défauts dans l'expression des enzymes oxydants ainsi que des perturbations touchant les hormones thyroïdiennes et hypophysaires pourraient être impliquées

On observe chez les personnes trisomiques de plus de 35 ans des changements neuro-histopathologiques similaires à ceux observés chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer de forme sporadique, âgés de plus de 60 ans : même distribution de plaques amyloïdes et de dégénérescences neurofibrillaires, même marquage des lésions par immunohistochimie. Ces modifications sont associées à une démence dans 30 à 40% des cas. De plus le métabolisme de l'APP, mesuré dans le plasma par les taux des peptides Abeta40 et Abeta42 est altéré chez les patients très jeunes (dès huit ans) (Mehta et al, 2003). Les raisons pour lesquelles les individus trisomiques développent ces lésions et présentent des risques accrus de démence sont inconnues. Bien que la duplication du gène APP apparaisse suffisante pour permettre l'expression de la maladie d'Alzheimer (Rovelet-Lecrux et al, 2006), d'autres gènes du chromosome 21 associés à APP pourraient être impliqués dans ce processus.

1.3 Le chromosome 21

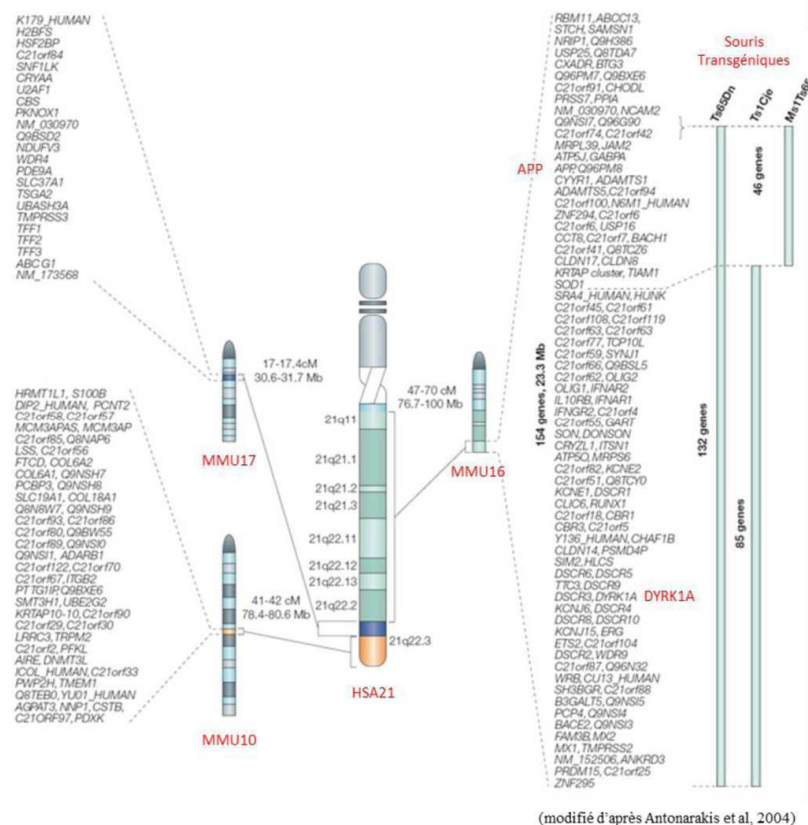
1.3.1 Sa structure

Le bras long du chromosome 21 (21q) fut séquencé à 99.7% en l'an 2000 puis référencé dans le cadre du séquençage du génome humain. Le chromosome 21 est de type acrocentrique, c'est le plus petit des autosomes du caryotype humain. Il possède un bras court ou 21p et un bras long ou 21q, et couvre 1,5% du génome humain (Patil et al, 1994 ; Osoegawa et al, 1996 ; Lapenta et al, 1998 ; Wang et al, 1998). Plus de 271 gènes sont répertoriés dans les bases de données. Les recherches ont permis d'ores et déjà de constater que la plupart des gènes se trouvant sur le chromosome 21 humain se retrouvent sur trois chromosomes chez la souris : 10, 16 et 17 (**Figure 2**) (Guimera et al, 1997b ; Blouin et al, 1998 ; pour revue Antonarakis et al, 2004).

L'analyse phénotypique et génotypique de patients porteurs de trisomies 21 partielles a permis de définir une région critique du chromosome 21 dont la duplication est associée à l'apparition de 13 signes caractéristiques (selon la liste de Jackson, 1976) de la trisomie 21 dont le retard mental. Cette région, appelée DCR-1 (nomenclature du 6th Intl Workshop, Cold Spring Harbor) (Korenberg et al, 1996-1997) ou Down syndrome Chromosomal Region 1,

s'étend sur 2,3 Mb et est localisée entre les gènes CBR et ERG en 21q22.2 (Rahmani et al, 1989 ; Delabar et al, 1993 ; Dahmane et al, 1998).

La DCR-1 (**Figure 3**) représente 1/20^{ème} du bras long et contient une trentaine de gènes identifiés à l'heure actuelle. L'importance de cette région a été récemment renforcée par la publication d'observations portant sur une mère et ses deux enfants porteurs d'une petite duplication (13 gènes) située à l'intérieur de la région DCR-1 et qui semblerait impliquée dans l'établissement d'un retard mental, d'une dégénérescence de type Alzheimer, d'un retard de croissance, d'une hypotonie musculaire et d'une hyperlaxité ligamentaire (pour revue Antonarakis et al, 2004 ; Arron et al, 2006 ; Ronan et al, 2007 ; Rachidi et al, 2008). Une étude japonaise plus récente (Fujita et al, 2010) semble confirmer l'hypothèse selon laquelle l'expression des gènes situés au niveau de la DCR-1 serait impliquée dans le développement physiologique et pathologique du cerveau et aurait un lien avec la dégénérescence de type Alzheimer observée chez les personnes trisomiques. Une microdélétion au sein de cette région a été mise en évidence lors d'études chez des enfants trisomiques présentant une microcéphalie sévère, un retard de croissance, une opacité de la cornée et un retard mental prononcé. Ces résultats sont cohérents avec une autre étude (Belichenko et al, 2009) mettant en avant dans cette région la localisation de gènes importants pour le développement neurologique



(modifié d'après Antonarakis et al, 2004)

Figure 2
Régions synténiques entre le chromosome 21 humain et les chromosomes de souris (MMU) 10, 16 et 17 (adapté d'après Antonarakis et al, 2004).

Le chromosome 21 humain est le plus petit des autosomes, il est acrocentrique et compte à l'heure actuelle plus de 271 gènes représentant 1,5 % du génome humain. Les gènes présents sur le chromosome 21 humain se répartissent sur trois chromosomes chez la souris : 154 gènes (23,3 Mb) du chromosome 21 se trouvent sur le chromosome MMU16, parmi eux, *DYRK1A* et *APP*. Trois modèles de souris transgéniques, trisomiques pour une partie des gènes du MMU16 pour les Ts1Cje et Ms1Ts65 et trisomiques pour tous les gènes du MMU16 pour les Ts65Dn.

A droite sont indiqués les modèles d'études murins permettant d'étudier les différents gènes du chromosome 21. Certains modèles contiennent la DCR-1 : les souris Ts1Cje, Ts65Dn, Ts16, ES#21 et Tc1 sont des souris transgéniques utilisées pour les études sur la trisomie 21. Les souris 152F7 sont des souris transgéniques portant un YAC humain comprenant gène codant la kinase *DYRK1A*.

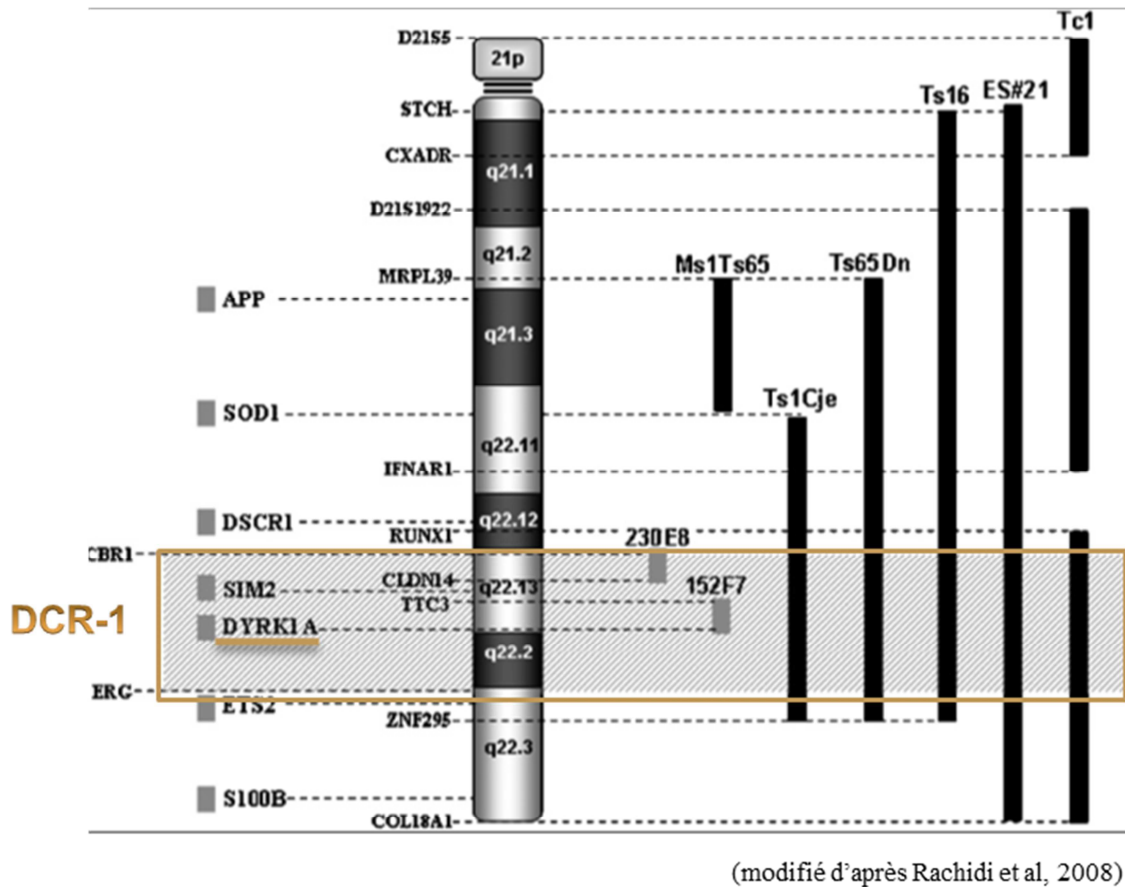


Figure 3
La région DCR-1 « Down Syndrome Chromosomal Region-1 » (adapté d'après Rachidi et Lopes, 2008).

La région DCR-1 (zone grisée) est localisée entre les loci 21q22.13 et 21q22.2. Elle s'étend entre les gènes *CBR1* (codant l'enzyme carbonyle réductase) et *ERG* (codant le facteur de transcription de la famille des Ets) et comprend le gène *DYRK1A* (codant l'enzyme kinase à double spécificité Tyr-Ser/Thr). Elle est désignée « région critique » car elle contient certains gènes associés à plusieurs phénotypes caractéristiques des personnes trisomiques. La DCR-1 est impliquée dans le développement du cerveau.

1.3.2 Gènes candidats ? Pourquoi pas !

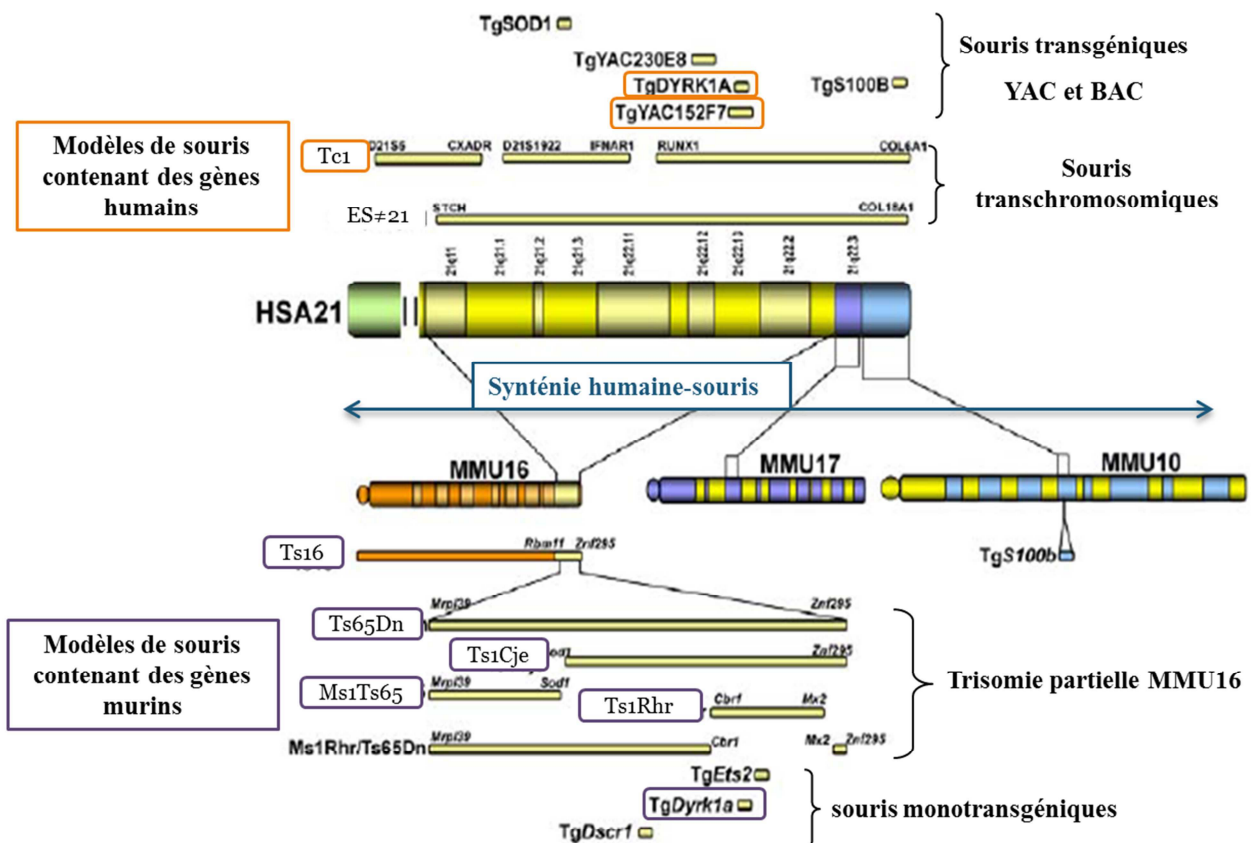
Plusieurs résultats collectés au cours des vingt dernières années laissent penser que tous les gènes portés par le chromosome 21 ne sont pas impliqués dans le retard mental et que seule une petite portion d'entre eux en est la cause (pour revue Antonarakis et al, 2004 ; Olson et al, 2007 ; Lyle et al, 2009). On peut faire la même analyse pour d'autres signes phénotypiques comme les malformations cardiaques ou les anomalies de la face. Ces hypothèses amènent à définir la notion de gènes candidats en utilisant un ou plusieurs critères :

- ✓ Territoires d'expression reliés au phénotype : un gène candidat sera le plus souvent exprimé dans le territoire d'expression du phénotype
- ✓ Fonctions : les données fonctionnelles associées au gène permettent de classer des candidats potentiels
- ✓ Niveau de surexpression dans le tissu cible : tous les gènes en trois copies ne sont pas surexprimés et l'existence d'une surexpression dans le territoire concerné par le phénotype étudié est constitué un pré requis.
- ✓ Localisation chromosomique de régions critiques

Selon ces critères, parmi les gènes susceptibles d'être de bons candidats, *CRYA1* est candidat dans l'apparition de la cataracte, *SOD* dans l'apparition du vieillissement accéléré et de déficits immunitaires, *APP* dans l'apparition de la maladie d'Alzheimer et *DYRK1A* dans l'apparition du retard mental mais aussi de la maladie d'Alzheimer (Ait Yahya-Graison et al, 2007 ; pour revue Megarbane et al, 2009). Ce dernier gène fait l'objet de notre étude

1.3.3 Les modèles d'études murins

Afin de comprendre et d'étudier les effets de la surexpression des gènes mais aussi leurs fonctions physiologiques, différents modèles murins sont utilisés. Deux stratégies complémentaires sont actuellement développées pour modéliser les effets de la trisomie 21 chez la souris. Quelques modèles murins sont représentés la **Figure 4** :



(modifié d'après Delabar et al, 2006)

Figure 4
Les modèles d'études murins du Syndrome de Down (adapté d'après Pennachio et al, 2003 ;
 Delabar et al, 2006)

Le séquençage des génomes humain et murin et les études de comparaison des génomes ont permis de mettre en évidence des segments synténiques conservés. Les régions homologues du chromosome 21 humain sont localisées au niveau de trois chromosomes chez la souris (MMU10, MMU16 et MMU17). La première région se trouve sur MMU10 et contient 58 gènes, la deuxième sur MMU17 et contient 23 gènes et enfin la troisième région s'étend sur 23,3 Mb et comprend plus de 154 gènes. Deux sortes de modèles existent : des modèles murins contenant des gènes murins (par exemple les Ts65Dn, les TS1Cje et les Ts16) et des modèles murins contenant des gènes humains (comme les Tc1, les TgYAC152F7 et les ES#21).

1.3.3.1 *Trisomies partielles pour un grand nombre de gènes murins*

La partie distale du chromosome 16 murin est synténique d'une grande partie du bras q du chromosome 21 humain. Les trisomies 16 complètes sont létales chez la souris. Deux lignées de souris, porteuses de translocations non équilibrées, aboutissant à des trisomies 16 partielles, ont été créées : les Ts65Dn (Davisson et al, 1993), avec une trisomie pour un fragment correspondant à 123 gènes identifiés chez l'homme, et les Ts1Cje (Sago et al, 2000) avec une trisomie correspondant à 91 de ces mêmes gènes humains. Ces deux lignées contiennent la région synténique de la DCR-1.

Les premières observations effectuées sur les Ts65Dn identifient des modifications au niveau du cerveau et du cervelet proches de certaines de celles observées dans la trisomie 21 (Holtzman et al, 1996 ; Haydar et al, 1996 ; Baxter et al, 2000). Certaines, comme la réduction du volume cérébelleux sont présentes chez les Ts1Cje (Olson et al, 2004a).

Ces modifications sont absentes chez un troisième modèle, les Ms1Ts65, contenant une duplication correspondant à 32 gènes 24. On a donc bien, chez la souris, des manifestations morphologiques induites par la duplication d'un fragment chromosomique qui sont associées à la duplication d'une petite région du 16 murin.

1.3.3.2 *Souris transgéniques par insertion de YACs (contenant un ou plusieurs gènes humains)*

Smith et Rubin ont utilisé des YACs humains, provenant du contig que nous avons décrit dans la DCR-1, pour construire des modèles par injection de ces YACs dans des ovocytes de souris FVB/N (ce sont les YACs 285E6, 152F7, 141G6 et 230E8) (Smith et al, 1995). Deux lignées ont été obtenues par YACs (avec une à deux copies seulement) et une première analyse a fait apparaître des modifications morphologiques et comportementales pour deux de ces YACs (Smith et al, 1997). Le YAC humain 152F7 contient cinq gènes connus DSCR5, TPRD, DSCR9, DCRA, DYRK1A dans un ordre proximal-distal sur le chromosome 21. Il chevauche en partie le YAC 141G6 qui contient les gènes DCRA, DSCR9, TPRD, DSCR5 et DSCR6. Lorsqu'un phénotype apparaît dans les tgYAC152F7 et qu'il est absent dans les tgYAC141G6 on peut supposer que c'est le gène DYRK1A qui est en la cause ou bien la combinaison de la surexpression de ce gène et d'un autre gène porté par ce

même YAC. Or plusieurs modifications phénotypiques apparaissent dans les souris porteuses de la lignée 152F7 sur fond génétique FVB/N : une modification globale au niveau du cerveau observable par des mesures de poids et des modifications comportementales accompagnées de la diminution des capacités d'apprentissage.

1.3.3.3 *Les modèles monogéniques*

Il existe plusieurs types de construction (ADNc, gène) utilisées pour la réalisation de ces modèles qui permettent d'attribuer un phénotype à la surexpression d'un seul gène. En exemples, nous citerons certains des modèles que nous avons précédemment construits et/ou analysés.

Modèle SIM2 (BAC, gène humain)

Le gène *sim2* (*DCR-1*) est un facteur de transcription de type bHLH impliqué dans la neurogenèse précoce. Il est aussi exprimé dans le cartilage et le muscle. La forme courte de ce gène est un marqueur de tumeurs du colon.

Nous avons construit des souris transgéniques pour le gène *SIM2* humain en utilisant la technique d'injection directe dans les ovocytes. Le transgène est un BAC de 200kb contenant les séquences régulatrices. La première lignée correspond, par accident d'insertion, à une invalidation du gène endogène et présente un phénotype rappelant une description précédente d'un modèle d'invalidation montrant des modifications du squelette vertébral et une forte obésité. La deuxième lignée surexprime le gène *sim2* d'un facteur 1,5.

Souris SOD (gène humain)

Ces animaux transgéniques possèdent 16 copies d'un fragment de 11kb contenant le gène *SOD1* entier. (Paris D et al, Mouse Genome 1996, 93 :1038-1040). La surexpression est de 3 à 10 suivant les organes et l'âge et produit plusieurs modifications phénotypiques.

Souris APP (pPRnp -ADNc humain)

Cette construction faite dans le laboratoire de G. Carlson utilise un promoteur prion pour contrôler l'expression d'APP, 28 copies aboutissant à une surexpression de 1,5 (Carlson et al, 1997).

Protéine DYRK1A : candidat pour le retard mental et la dégénérescence dans le Syndrome de Down

La région DCR-1 contient 20 gènes dont la sérine/thréonine kinase, DYRK1A, qui est l'un des principaux gènes candidats. DYRK1A est une protéine qui appartient à la famille des Dual-specificity tyrosine-Regulated Kinases ou DYRK, protéines kinases à double spécificité (Tyr-Ser/Thr kinases).

L'implication de cette protéine dans le retard mental et la dégénérescence du SD a été mise en évidence dans les années 1990, avec des études menées chez la drosophile et les rongeurs.

Chez la drosophile, le gène *minibrain (mnb)* code une protéine Ser/Thr kinase qui est impliquée dans la régulation du nombre de cellules neuronales. En effet, lorsque *mnb* est muté et non fonctionnelle, on observe une réduction de taille des lobes optiques et des hémisphères cérébraux, un déficit dans l'apprentissage et une hypoactivité (Tejedor et al, 1995). L'homologue de *mnb* chez le rat et la souris est *Dyrk*. Deux transcrits de 6.1 kb et 3.1 kb ont été identifiés par hybridation *in situ*, dans le cerveau, en particulier dans le bulbe olfactif, le cortex cérébral, les cellules pyramidales de l'hippocampe et des noyaux de l'hypothalamus. (Guimera et al, 1996 ; Kentrup et al, 1996). L'ensemble des données obtenues sur Mnb et Dyrk suggère que cette kinase a un rôle dans la neurogenèse, un processus très conservé chez les Vertébrés.

L'importance de ce gène a été renforcée par les résultats d'études fonctionnelles et par l'analyse phénotypique de modèles de surexpression (Guimera et al, 1996 ; Song et al, 1996 ; Shindoh et al, 1996 ; Smith et al, 1997 ; Ohira et al, 1997). La surexpression de DYRK1A dans un modèle de souris transgéniques a permis de montrer que l'activité kinase pourrait être impliquée dans certains processus liés à l'apprentissage et à la mémoire (Alvarez et al, 2007). Les études préliminaires chez les souris Ts65Dn (Reeves et al, 1995 ; Coussons-Read et al, 1996 ; Dierssen et al, 1997 ; Escorihuela et al, 1998 ; pour revue Kola et Hertzog, 1998) ainsi que les TgDyrk1A (Altafaj et al, 2001) et les Dyrk1A^{+/-} et Dyrk1A^{-/-} (Fotaki et al, 2002) révèlent l'importance de DYRK1A. Chez les TgDyrk1A, la surexpression de Dyrk1A

favorise un développement tardif des motoneurones, conduisant à une hypotonie, et une hyperactivité, similaire aux Ts65Dn, qui semble être dépendante des facteurs environnementaux. Des déficits cognitifs incluant la mémoire spatiale, qui requiert l'intégration d'informations visuelles et spatiales, sans altération de la mémoire de travail contrairement aux Ts65Dn, sont décrits chez les TgDyrk1A et révèlent un profil de dysfonctionnement de l'hippocampe et du cortex préfrontal (Altafaj et al, 2001). Chez les Dyrk1A^{+/-} et Dyrk1A^{-/-}, les résultats montrent clairement un défaut de développement du système nerveux central, une réduction du nombre de neuroblastes et une dérégulation de la différenciation neurale (Fotaki et al, 2002). L'ensemble de ces données a conduit à considérer DYRK1A comme une enzyme contribuant à certains phénotypes pathologiques de la trisomie 21 et plus particulièrement au déficit mental (Alvarez et al, 2007).

1.1 Les kinases

1.1.1 Généralités sur les kinases

Les kinases sont des enzymes du groupe des transférases qui catalysent les réactions de phosphorylation par addition d'un groupement phosphate sur un substrat (protéine, lipide, sucre) (Hanks et Hunter, 1995 ; pour revue Ubersax et al, 2007).

Le mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation est un mécanisme de régulation extrêmement courant dans la cellule, on estime par exemple qu'environ 30% du protéome est régulé par ce biais. La famille des kinases est une très grande famille, présentant une grande diversité tant concernant leurs mécanismes, leurs formes, le lieu de leurs actions et de leurs synthèses que leurs actions et leurs interactions. Elles régulent toutes les fonctions cellulaires à diverses étapes et permettent d'accélérer des réactions et d'amplifier les stimuli (Cheek et al, 2005). Les kinases sont regroupées dans un ensemble appelé le kinome, représentant près de 2% du génome (pour revue Manning et al, 2002 ; pour revue Taylor et Kornev, 2011).

Une des façons de classifier les kinases est de les trier par homologies et degrés de similitude. Dans ce cas, les kinases appartiennent à deux superfamilles : les kinases eucaryotes typiques (ePK), qui sont au nombre de 478 et les kinases atypiques (aPK) au

nombre de 40. Les superfamilles vont différer par leurs domaines catalytiques et par leurs activités kinasiques. Les ePK présentent une certaine similitude concernant leur domaine catalytique (Hanks et al, 1988 ; pour revue Manning et al, 2002). DYRK1A appartient à la superfamille ePK, du groupe CMGC (DYRK, CDK, MAPK, GSK, CK2 α et SRPK). Ce groupe contient huit familles et vingt-quatre sous-familles (pour revue Manning et al, 2002 ; Kannan et Neuwald, 2004 ; pour revue Becker et al, 2011).

Une autre façon de classer les kinases est de considérer le seul domaine catalytique et plus précisément le site de fixation du donneur de groupement phosphate (ATP et/ou GTP). Avec ce critère, on distingue trois familles :

- Les protéines sérines/thréonines (Ser/Thr) (PSTK) qui représentent 80% des kinases. Parmi les plus communes, on peut citer PKA, PKC, PKG, les CAMK (Kinase Ca²⁺-Calmoduline dépendante), les MAPK dont ERK, les GSK3 (pour revue Bayer et Schulman, 2001 ; pour revue Ubersax et al, 2007 ; pour revue Shi Y, 2009).

- Les protéines tyrosines kinases (PTK), (environ 20% des kinases), qui phosphorylent des résidus tyrosines d'une séquence consensus d'un substrat protéine. Elles sont divisées en deux groupes, d'une part les PTK solubles cytoplasmiques et nucléaires (Pawson, 1995 ; pour revue Pawson et Kofler, 2009) et d'autre part, les récepteurs PTK transmembranaires, qui sont activées par la médiation d'un facteur de croissance et/ou d'un ligand qui s'y fixe induisant un changement de conformation du domaine intracellulaire et une autophosphorylation intramoléculaire. TRKA sur lequel se fixe le NGF est un exemple de récepteurs PTK (pour revue Schlessinger, 2000 ; pour revue Hubbard et Miller, 2007).

- Les protéines tyrosines-sérines/thréonines (Tyr-Ser/Thr) kinases, représentent la troisième famille, très minoritaire en proportion. Ce sont des protéines à double spécificité qui sont capables de phosphoryler des résidus Ser/Thr mais aussi Tyr. Elles sont appelées les Dual-Specificity Kinase (DSK) ou Sérine-Thréonine-Tyrosine Kinase (STYK) (pour revue Lindberg et al, 1992 ; Becker et al, 1998 ; pour revue Dhanasekaran et al, 1998). La famille des DYRK (dont DYRK1A) appartient à cette famille, elles s'autophosphorylent sur des résidus Tyr, situés dans la boucle d'activation, afin de phosphoryler des résidus Ser/Thr au niveau de la séquences consensus des protéines cibles.

1.1.2 Structures générales des kinases

Les kinases possèdent trois domaines :

Le domaine central ou domaine catalytique (**Figure 5**), est hautement conservé, il porte l'activité kinase. Les régions Nter et Cter sont des régions plus variables selon les kinases (Hanks et al, 1988 ; Hanks et Quinn, 1991 ; Hanks et Hunter, 1995 ; pour revue Kornev et Taylor, 2010 ; pour revue Taylor et Kornev, 2011). Le domaine catalytique permet la liaison et l'orientation du donneur de groupement phosphate vers le groupement accepteur (résidus Ser, Thr, Tyr du substrat).

Le domaine N qui comprend quatre sous-domaines (I à IV) s'organise en feuillets β et hélices α , conférant une structure très flexible, il va participer à la formation de la poche hydrophobe qui va recevoir l'ATP ou le GTP au cours du cycle catalytique et va jouer un rôle dans le transfert du phosphate (pour revue Kornev et Taylor, 2010).

Le fragment liant les domaines N et C comprend le domaine V, formé de deux feuillets β , il ne possède pas de séquence consensus, il possède un rôle d'aide à l'ancrage de l'ATP, participe à la formation de la poche hydrophobe et à la liaison du substrat en établissant des liaisons hydrogènes et ioniques (pour revue Kornev et Taylor, 2010).

Le domaine C (**Figure 6 et 7**) comprend les domaines VI à XI et va s'organiser également en feuillets β et hélices α . Les domaines VIB et VII contiennent des séquences consensus et sont formés de feuillets β . Les feuillets du domaine VIB forment la boucle catalytique qui renferme le site actif, c'est-à-dire les résidus Ser, Thr et Tyr impliqués dans l'activation de la protéine kinase.

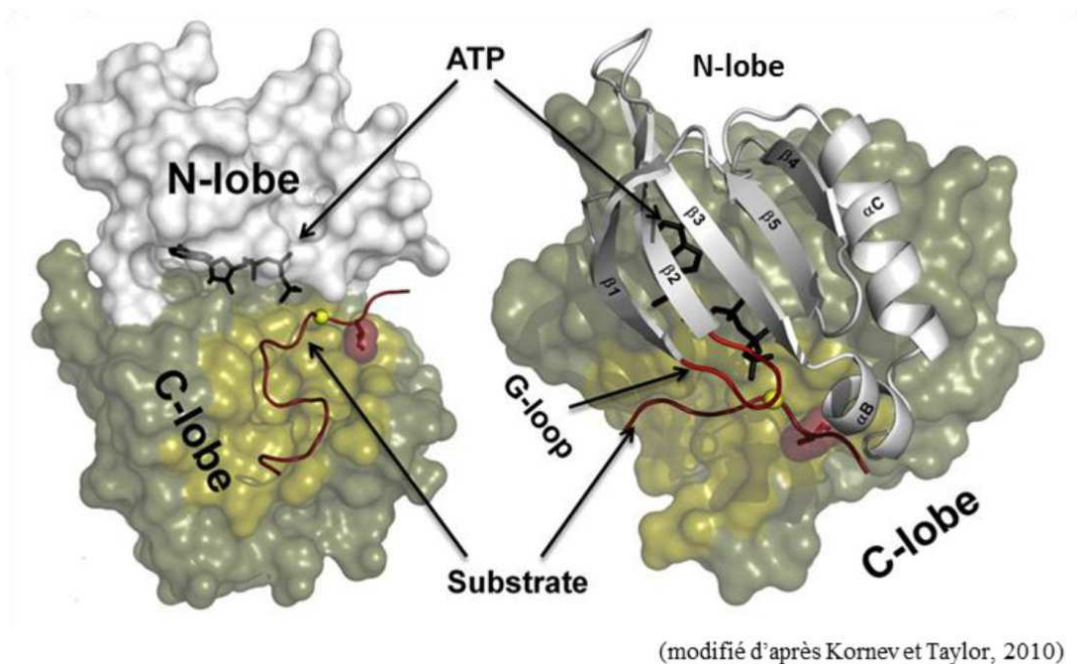
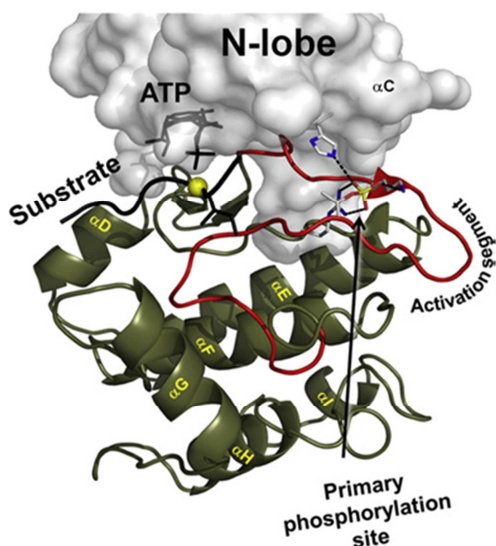


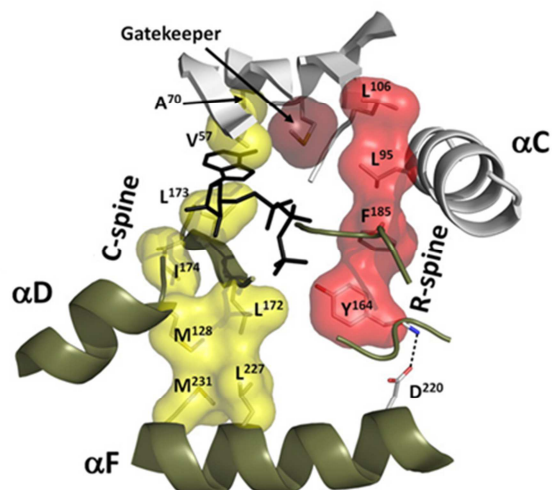
Figure 5
Structure tridimensionnelle d'une protéine kinase de la famille des ePK et de son domaine catalytique (d'après Kornev et Taylor, 2010)

Une protéine kinase type est composée d'un lobe N et d'un lobe C. l'ATP se positionne et se fixe au sein d'une poche plus ou moins profonde formée entre les deux lobes. Le substrat à phosphoryler se fixe sur un site spécifique situé au niveau du lobe C

Le lobe N (vue aérienne à droite) comporte 5 feuillets β et une hélice αC . Cette hélice est associée à l'activation de l'enzyme. Il a une structure flexible par la présence d'une boucle appelé « G-loop » associant les feuillets $\beta 1$ et $\beta 2$



6 (modifié d'après Kornev et Taylor, 2010)



7 (modifié d'après Kornev et Taylor, 2010)

Figure 6 et 7 Structure tridimensionnelle du lobe C et des épines C et R d'une protéine kinase de la famille des ePK (d'après Kornev et Taylor, 2010)

Figure 6 : Le lobe C est composé d'hélices α et d'un segment d'activation (en rouge) situé à proximité de l'hélice αC du lobe N. Au sein de la boucle catalytique se trouve le site de phosphorylation primaire, responsable de l'activation de l'enzyme.

Figure 7 : La flexibilité de l'enzyme est permise par la présence d'un modèle en épine et permet et facilite les interactions nécessaires à la liaison de l'ATP et du substrat. Ce modèle est composé d'une épine catalytique ou « C-spine » en jaune et d'une épine régulatrice ou « R-spine » en rouge. Le résidu Met120 localisé au niveau du feuillet $\beta 5$ contrôle l'accès de l'ATP ou « gatekeeper ».

1.1.3 Rôles dans le système nerveux

Les kinases jouent un rôle important dans la plasticité synaptique et entrent dans la constitution des synapses. La plasticité synaptique représente l'ensemble des changements structuraux et moléculaires intervenant au niveau des synapses au cours de l'apprentissage et de la mémorisation. Les neurotransmetteurs qui sont libérés dans la fente synaptique vont se fixer sur leurs récepteurs spécifiques. Le récepteur peut être un canal ionique comme les NMDAR ou AMPAR, couplé à la protéine G comme les GnRHR, à activité tyrosine kinase comme TrkA et TrkB et d'autres types. Cette fixation active le récepteur ce qui induit la transduction du signal *via* les différentes voies de signalisation. Les kinases (CAMKII, DYRK1A, MAPK, PKA, PKC...) vont alors jouer des rôles essentiels et indispensables dans cette transduction du signal. Les études sur les modèles murins de la trisomie 21 ont permis de suggérer le rôle probable de ces kinases dans l'établissement d'un retard mental chez les personnes trisomiques ainsi que dans l'apparition de plaques amyloïdes, de dégénérescences neurofibrillaires et de démence (pour revue Lee, 2006).

Ces kinases ont un rôle essentiel dans la LTP, via un lien étroit entre les CAMKII, PKA, PKC, DYRK1A et les récepteurs AMPA et NMDA et induisent la transcription de nombreux gènes par activation de nombreux facteurs de transcription comme par exemple l'activation de CREB par DYRK1A. Elles ont un rôle dans la régulation des récepteurs eux-mêmes, c'est-à-dire leur désensibilisation, leur agrégation membranaire (pour revue Collingridge et al, 2004 ; pour revue Lee, 2006) et dans le développement embryonnaire incluant celui du cerveau (pour revue Rice et Barone, 2000 ; Ballif et al, 2004). Elles sont indispensables pour le bon déroulement de la prolifération, la migration, la différenciation, l'apoptose, la croissance axonale et dendritique, la synaptogénèse. A ce titre, DYRK1A est représentatif de ces multiples fonctions.

Les kinases, outre leurs rôles dans la plasticité synaptique, vont intervenir dans le développement du cerveau (Ballif et al, 2004), au cours duquel interviennent les processus de prolifération cellulaire, de migration et différenciation cellulaire, d'apoptose, de croissance axonale et dendritique et de synaptogénèse. Pour que tous ces événements puissent s'effectuer, de très nombreux facteurs moléculaires, dont des kinases, vont être mis à

contribution lors de l'embryogénèse (pour revue Rice et Barone, 2000 ; pour revue Huang et Reichardt, 2001 ; pour revue Reichardt, 2006).

1.2 La protéine DYRK1A

1.2.1 Gène

Le gène *DYRK1A* est localisé sur le chromosome 21, sur le bras long dans la région DCR-1 en 21q22.13, 11 transcrits et 5 isoformes ont été mis en évidence. Ce gène s'étend sur 148.5 kb et comporte 16 exons et 15 introns (Wang et al, 1998 ; Guimera et al, 1999 ; Yamada et al, 2004 ; Maenz et al, 2008) (**Figure 3**). Le promoteur du gène est sans boîte TATA, et présente une région riche en CG. Trois îlots CpG sont mis en évidence (CpGplot, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/>) de -1049 à +1344 : un premier de 907 pb (de -1049 à -143), un deuxième de 1108 pb à cheval sur le site d'initiation de transcription (SST) (de -131 à +976) et un troisième de 293 pb (de +1052 à +1344) (Yamada et al, 2004 ; Maenz et al, 2008). Des sites de liaison pour des facteurs de transcription comme SP1, CREB, AP4 sont présents en région 5' (Guimera et al, 1999 ; Maenz et al, 2008). Des études de CHIP-Seq ont montré au niveau du promoteur essentiel du gène *DYRK1A* des sites de fixation pour l'ARN polymérase II et une régulation épigénétique a été détectée au niveau des histones H2AZ et sur la lysine 4 de l'histone H3 (H3TriMeK4). Ces trois marqueurs sont caractéristiques d'une activité transcriptionnelle (Maenz et al, 2008). En 3', une séquence signal de Polyadénylation (AATAAA), trois queues poly A atypiques et sept motifs ATTTA impliqués dans la déstabilisation de l'ARN, suggérant une régulation par des microRNA, ont été mis en évidence par séquençage d'ADNc (Guimera et al, 1999).

Ont été identifiés à l'heure actuelle 62 orthologues de *DYRK1A*. Chez la souris, le gène *Dyrk1A* est localisé sur le chromosome 16qC6, il mesure 125 kb (Song et al, 1997). Chez le rat et la souris, le gène *Dyrk1A* est localisé sur le chromosome 11q et 16q (Kentrup et al, 1996) ; Chez la drosophile, il est situé sur le chromosome X16E2-16F1 et porte le nom de *minibain* ou *mnb* (Tejedor et al, 1995). Chez l'Homme, huit paralogues de DYRK1A existent : quatre appartenant à la famille des *DYRK* (*DYRK1B*, *DYRK2*, *DYRK3* et *DYRK4*) et quatre à la famille des *HIPK* (Homeodomain-Interacting Protein Kinase, *HIPK1*, *HIPK2*,

HIPK3 et *HIPK4*). Leurs localisations chromosomiques, le rôle de chacun de ces gènes, la taille de leur protéine, le nombre de transcrits alternatifs, leurs expressions et localisations cellulaires sont différentes de *DYRK1A* (pour revue Hämmerle et al, 2003 ; pour revue Park et al, 2009a/b).

1.2.2 Expression

D'après les études réalisées *in vivo* et *in vitro* chez les Vertébrés, l'expression de *DYRK1A* est ubiquiste. Sa localisation est cytoplasmique et/ou nucléaire (Guimera et al, 1999 ; Okui et al, 1999).

Chez la drosophile, trois transcrits alternatifs du gène *mnb* ont été identifiés de tailles 6.1kb (majoritaire), 4.4 kb et 4.2 kb. Ces transcrits sont exprimés à différents stades du développement embryonnaire et au stade adulte (Tejedor et al, 1995). Chez le rat, deux transcrits de 6.1 kb (majoritaire) et 3.1 kb sont détectés et sont exprimés de manières différentes aux stades embryonnaires et adulte. Au cours du développement embryonnaire le transcrit de 6.1 kb est exprimé entre autre dans le cortex cérébral, dans l'hippocampe, l'hypothalamus et le mésencéphale (Okui et al, 1999). Chez l'adulte, les deux transcrits sont ubiquistes ; ils sont exprimés notamment dans le cœur, les muscles, les organes reproducteurs, les organes lymphoïdes primaires, les poumons et le cerveau (Kentrup et al, 1996 ; Becker et al, 1998). Chez la souris, au cours du développement embryonnaire deux transcrits ont été mis en évidence de taille 6.1 kb et 4 kb. A E13-15.5 ; ils sont détectés majoritairement dans la moelle épinière, au niveau du télencéphale, des lobes olfactifs et de l'ébauche optique. Cependant, un signal est perceptible dans le mésencéphale et le métencéphale. A E17, le signal est majoritaire au niveau de l'œil, des lobes olfactifs et du cortex cérébral (Song et al, 1996 ; Shindoh et al, 1996). Après la naissance, les transcrits détectés chez la souris sont également au nombre de deux, mais de tailles différentes. Un de 6.1 kb (majoritaire) et un de 3.1 kb. C'est dans les bulbes olfactifs, le cortex cérébral, l'hippocampe, le thalamus et le cervelet que ces transcrits sont généralement détectés bien que ce signal soit aussi visible dans le cœur, les poumons, le foie et les organes reproducteurs (Guimera et al, 1996). Enfin chez l'Homme, le gène *DYRK1A* code deux transcrits alternatifs. Un majoritaire de 6.1 kb exprimé au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte. Chez le fœtus humain, on le retrouve dans les tissus cérébraux, le foie, les poumons à différents stades du développement. Chez l'adulte, l'expression de ce transcrit est ubiquiste avec un gradient d'expression. Il est

fortement exprimé dans le cerveau (dans l'hippocampe, le cortex cérébral, le cervelet, le thalamus), dans les muscles et les organes reproducteurs ; en revanche, son expression est faible dans les poumons. Le deuxième transcrit, minoritaire, de 7.5 kb est exprimé dans le cœur, le placenta et les organes reproducteurs (Guimera et al, 1997a et 1999, Chen et al, 1997).

Au niveau du cerveau d'embryons de souris, Dyrk1A est exprimé durant la neurogenèse au niveau des cellules épithéliales du tube neural, de la crête neurale et des placodes ectoblastiques et dans le cerveau antérieur au sein du bulbe olfactif, de l'hippocampe, du thalamus et de l'hypothalamus, dans le mésencéphale, en particulier dans le cervelet en développement et dans les noyaux du tronc cérébral et enfin dans le rhombencéphale (Rahmani et al, 1998 ; pour revue Hämmerle et al, 2003 ; Hämmerle et al, 2008). Chez les souris adultes, l'expression de Dyrk1A est détectée au sein du cerveau antérieur, du mésencéphale et du cerveau postérieur tout particulièrement dans le cervelet et la substance grise de la moelle épinière (Marti et al, 2003).

Chez le rat, au cours du développement embryonnaire, Dyrk1A est fortement exprimé dans le cerveau en particulier le cortex cérébral, l'hippocampe, l'hypothalamus, le mésencéphale et la moelle épinière. A l'âge adulte, cette expression est stable et ubiquiste dans le cerveau mais aussi dans d'autres organes tels que le cœur, le foie, les organes lymphoïdes primaires, les reins et les poumons (Okui et al, 1999).

Chez l'embryon humain et chez l'Homme adulte, DYRK1A a une expression majoritairement cytoplasmique (90% dont 80% associées à des protéines du cytosquelette) et dans le cerveau où seulement 10% est exprimée dans le noyau (Marti et al, 2003 ; Wegiel et al, 2004 ; Dowjat et al, 2007). Son expression est fortement détectée : dans le cortex cérébral au niveau des couches corticales les plus externes ainsi que dans le noyau caudé des noyaux gris centraux, dans certaines cellules de l'hippocampe, au sein des couches de cellules pyramidales et des interneurons de la Corne d'Amon1, dans la substance noire au sein des neurones dopaminergiques ainsi que dans l'amygdale et le thalamus. En revanche elle est plus faible dans le *putamen* et le *globus pallidus* des noyaux gris centraux. Dans le cervelet, DYRK1A est exprimée dans les cellules de Purkinje, les cellules granulaires du cortex cérébelleux, le noyau dentelé et l'olive bulbaire inférieure (Marti et al, 2003 ; Wegiel et al, 2004). Le taux de DYRK1A est relativement identique dans les cortex frontaux, temporaux et

occipitaux (Dowjat et al, 2007). Il est intéressant de noter que malgré son expression globalement ubiquiste, DYRK1A est fortement exprimée au niveau de l'hippocampe, du cervelet, du thalamus et de la substance noire des personnes âgées (Wegiel et al, 2004 ; pour revue Wegiel et al, 2011).

Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, l'expression de DYRK1A est identifiée par des études *in vitro*, *in vivo* et *postmortem*. DYRK1A est exprimée entre autre au niveau de l'hippocampe et du cortex frontal. Son expression semble être associée à l'apparition et au développement de la pathologie (pour revue Head et al, 2007 ; pour revue Wegiel et al, 2008, 2011). Chez les personnes atteintes du Syndrome de Down, les études sont peu nombreuses et ont été réalisées sur des cerveaux fœtaux et adultes. DYRK1A est surexprimé d'un facteur 1.5 dans le cortex cérébral, chez les fœtus et chez l'adulte (Guimera et al, 1999 ; Cheon et al, 2003) au niveau de l'hippocampe, des cortex temporaux, frontaux, occipitaux et cérébelleux, le corps calleux et la substance blanche du cervelet (Dowjat et al, 2007).

1.2.3 Structure

La protéine DYRK1A (**Figure 8**) appartient à la famille des DYRK, qui ont la propriété de s'activer par autophosphorylation sur des résidus Tyr situés dans la boucle d'activation au niveau du domaine VIB pour ensuite phosphoryler les résidus Ser/Thr de leurs protéines cibles. DYRK1A présente une structure primaire très conservée au cours de l'évolution (pour revue Park et al, 2009b ; pour revue Becker et al, 2011), et comprend 763 acides aminés. Son transcrit, après épissage alternatif, comprend 11 exons d'une longueur de 2.4 kb. Sa masse moléculaire est de 85.6 kDa (Guimera et al, 1999).

Des études de comparaisons de séquences de DYRK1A entre la souris, le rat et l'Homme, révèlent une identité de séquence à hauteur de 99% (Kentrup et al, 1996 ; Guimera et al, 1999). On retrouve chez DYRK1A la structure générale des kinases. Elle est composée de trois régions : la région Nter, la région Cter et la région centrale (**Figure 9**)

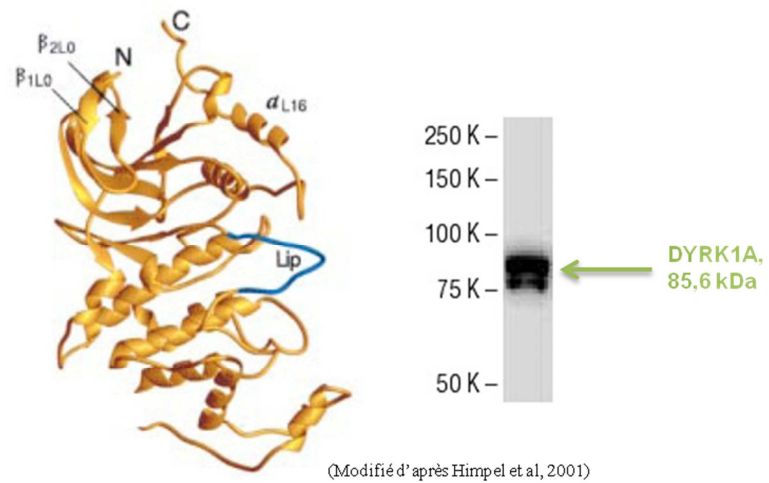


Figure 8
La protéine DYRK1A (d'après Himpel et al, 2000-2001)

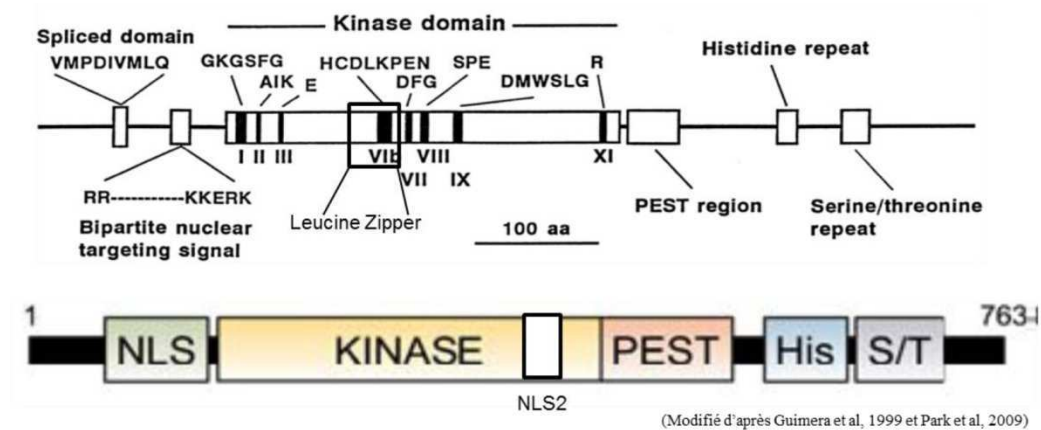


Figure 9
Structure linéaire de la protéine DYRK1A (adapté d'après Guimera et al, 1999 et Park et al, 2010).

DYRK1A est une protéine kinase à double spécificité possédant trois régions : N-terminale (aa 1 à 158), centrale (aa 159 à 479) et C-terminale (aa 480 à 763). Deux signaux de localisation nucléaire ou NLS sont identifiés : au niveau N-terminal et au niveau du domaine kinase (identification via le programme PROST II et confirmation par des expériences de transfection (Alvarez et al, 2003)). Ces signaux ont la propriété de cibler DYRK1A vers le noyau.

Le domaine kinase est composé de 12 sous-domaines : représentés par des rectangles noirs et désignés par des chiffres romains en accord avec la classification de Hanks and Quinn (1991). Ce domaine contient en plus du domaine de liaison de l'ATP, les signatures de la famille des kinases DYRKs incluant le résidu Cys286 et le triplet Ser310-Ser311-Cys312, ainsi que le site d'auto-activation Tyr319-Q320-Tyr321. L'autophosphorylation sur la Tyr321 est constitutive et nécessaire pour son activité kinase. Un motif Leucine-Zipper, important dans les interactions protéine/protéine et dans la liaison avec l'ADN, est trouvé dans le domaine central.

La région C-terminale est spécifique à la protéine DYRK1A et contient deux séquences riches en résidus Ser/Thr. Deux répétitions Histidine impliquées dans la localisation de DYRK1A dans des granules d'épissage nucléaire sont localisées entre deux régions riches en Ser/Thr.

La région Nter est constituée des 158 premiers acides aminés, et comprend la 1^{ère} séquence de signalisation nucléaire (NLS1) composée des aa 117 à 134 « RRHQGGQGDSSHKKERK ». NLS1 est commune à tous les membres de la famille DYRK (Hämmerle et al, 2003 ; Alvarez et al, 2003 ; pour revue Park et al, 2009b).

Le domaine central (ou catalytique) de DYRK1A est constitué des acides aminés de 159 à 479. Il est très conservé au cours de l'évolution. Il contient un domaine leucine zipper (bZIP) « Leu274-(X)₆ - Leu281-(X)₆ - Leu288-(X)₆ - Leu295 ». Sa présence suggère que DYRK1A est une protéine formant des dimères ou des multimères avec d'autres protéines nucléaires comme des facteurs de transcription et se liant à l'ADN afin de réguler la transcription de gènes cibles (Guimera et al, 1999 ; pour revue Park et al, 2009b). Ce domaine central est également composé des douze sous-domaines du domaine catalytique commun à toutes les kinases selon la classification de Hanks (de I à XI avec VIA et VIB). Ce domaine central présente donc toutes les séquences consensus et les résidus communs aux kinases ePK, ainsi que les motifs communs à la famille DYRK (Guimera et al, 1999 ; Alvarez et al, 2003 ; Kannan et Neuwald, 2004 ; pour revue Park et al, 2009b) :

- La Cys286 qui se trouve dans la séquence « His-Cys-Asp-Leu-Lys-Pro-Glu-Asn » au sein du sous domaine VIB.

- Le motif au sein du sous-domaine VII comprenant les acides aminés 307 à 312 dans lequel les résidus Ser310, Ser311 et Cys312 (qui suivent une séquence Asp307-Phe-Gly309) sont l'empreinte des kinases appartenant à la famille DYRK.

- Le motif Tyr319-Q-Tyr321 au sein du sous-domaine VIII. Ce motif est le site d'activation de DYRK1A par autophosphorylation.

C'est également dans ce domaine que l'on retrouve la seconde séquence de signalisation nucléaire (NLS2), spécifique de DYRK1A et constituée des résidus 389 à 395 (PKARKFF).

La région Cter, allant de l'acide aminé 480 à 763, est spécifique de la protéine DYRK1A. Elle diffère de celle des protéines kinases de la famille DYRK et de la superfamille des ePK. C'est une région riche en Ser/Thr. Elle comprend : (Tejedor et al,

1995 ; Shindoh et al, 1996 ; Guimera et al, 1999 ; Alvarez et al, 2003 ; pour revue Park et al, 2009b) :

- Le domaine PEST (Pro-Glu-Ser-Thr domain), commun avec la protéine DYRK1B, allant de l'acide aminé Pro497 à la Pro565. Ce domaine joue un rôle dans la dégradation des protéines cibles (chez la drosophile il est remplacé par le domaine GAS).
- Deux répétitions de résidus His qui suivent le domaine PEST. Elles vont de l'His599 à l'His602 et de l'His607 à l'His619 et jouent un rôle dans l'adressage de DYRK1A au niveau des granules d'épissages.
- Deux domaines riches en résidus Ser/Thr, 63% pour le premier et 60% pour le deuxième domaine, suivent les répétitions des résidus His. Ces deux domaines vont de la Thr487 à la Ser524 et sont très conservés.

1.2.4 Fonctions

Les protéines phosphorylées par DYRK1A interviennent dans diverses fonctions et font parties intégrantes de voies de transduction du signal (**Figure 10**) :

En raison de la multiplicité des fonctions exercées par ses cibles protéiques, DYRK1A est potentiellement associé, plus ou moins directement, à de nombreuses fonctions physiologiques et physiopathologiques :

- ✓ Morphogenèse du cerveau : contrôle du volume du cerveau et de la densité cellulaire, mise en place des neurones et des cellules gliales, mise en place des neurites.
- ✓ Régulation de la différenciation, de la prolifération et de la croissance cellulaire. DYRK1A participe au contrôle du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la survie cellulaire en phosphorylant des protéines comme la caspase 9 ou la P53.
- ✓ Contrôle de l'endocytose, de la fusion des vésicules synaptiques et de la libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique. DYRK1A phosphoryle des protéines synaptiques, ce qui lui confère un rôle de régulation de la plasticité synaptique.
- ✓ Transcription de gènes via la phosphorylation de facteurs de transcription comme CREB, NFAT, STAT3.

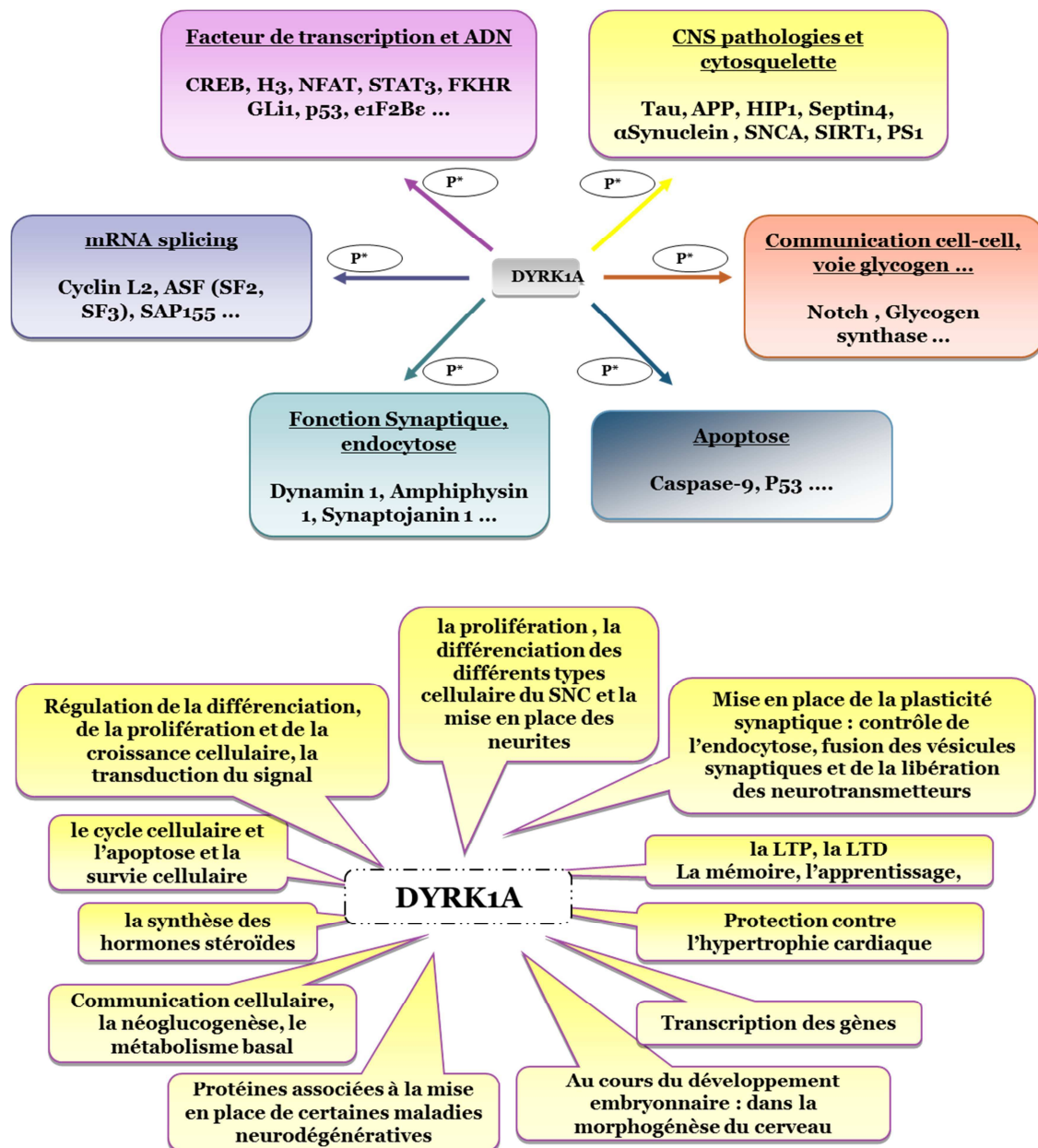


Figure 10
Les protéines cibles de DYRK1A et ses fonctions (adapté d'après Park et al, 2010 ; Wegiel et al, 2011 ; Guedj et al, 2012)

Les substrats que DYRK1A phosphoryle sont nombreux et exercent des fonctions variées. De ce fait, la protéine DYRK1A, ubiquiste, est impliquée dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques.

✓ Communications entre les cellules et métabolisme : glycogène, néoglucogenèse... DYRK1A phosphoryle des protéines intervenant dans ces mécanismes (Notch, Glycogène synthase ...).

✓ Protection de l'hypertrophie cardiaque.

✓ Certaines protéines (Cycline L2, ASF ...) intervenant dans l'épissage alternatif sont phosphorylées par DYRK1A.

✓ Des protéines associées à la mise en place de certaines maladies neurodégénératives sont phosphorylées par DYRK1A ou voient leurs phosphorylation modifiée par l'intervention de DYRK1A sur d'autres protéines : les protéines Tau et APP, la Setpin4 et l' α -Synucléine, la prenilin1.

Globalement, DYRK1A joue un rôle dans le maintien de l'activité neuronale chez l'adulte ainsi que dans la consolidation de la mémoire et l'apprentissage.

Certaines fonctions de DYRK1A ont été mises en évidence grâce à des études sur les modèles murins (Cf **Figure 4**). Trois de ces modèles expriment spécifiquement DYRK1A en trois copies : les souris transgéniques BAC DYRK1A (Ahn et al, 2006), les souris TgDyrk1A (Altafaj et al, 2001) et les souris TgYAC125F7 (Branchi et al, 2004).

Les souris transgéniques BAC DYRK1A montrent un déficit de la mémoire, de la LTP et de la LTD au niveau de l'hippocampe. On observe une hyperphosphorylation de la protéine Tau associée aux microtubules sur les Ser202, Thr212 et Ser404 (Ryoo et al, 2007), une augmentation de la phosphorylation de l'APP sur la Thr668 et de la production de l'A β dans l'hippocampe (Ryoo et al, 2008).

Les souris TgDyrk1A présentent une brachycéphalie, une hyperactivité, une locomotion altérée, un déclin cognitif et une altération de la mémoire spatiale (Altafaj et al, 2001). Au niveau du cervelet, plus précisément au niveau des synapses, une augmentation d'expression d'une des sous-unités du récepteur NMDA, la NR2A avec une diminution durable du transit du Ca^{2+} induit par ces récepteurs sont observées, suggérant que le phénotype de TgDyrk1A peut provenir d'une dérégulation des canaux NMDA et d'une altération de l'homéostasie calcique (Altafaj et al, 2008).

Les souris TgYAC125F7 manifestent une hyperactivité constante et une hypotonie, associées à une réduction de la densité neuronale dans le cortex cérébral, accompagnée d'un déficit de mémorisation et l'apprentissage et d'une augmentation de la taille du cerveau.

Concernant les mécanismes moléculaires, une réduction de la phosphorylation du facteur CREB et une augmentation de celle de FKHR et de la cycline B1 sont observées (Branchi et al, 2004).

Enfin des études faisant appel à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et à des analyses histologiques permettent de noter que le gène *DYRK1A* est impliqué au cours du développement, dans le contrôle du volume du cerveau et de la densité cellulaire mais également dans le contrôle de la plasticité synaptique et de la consolidation de la mémoire (Guedj et al, 2009 et 2012).

1.2.5 Propriétés enzymatique

Les protéines appartenant à la famille des DYRKs possèdent un mécanisme cinétique enzymatique à deux substrats, de type ordonné. Dans un tel système, l'ordre de fixation est obligatoire et conduit à la formation d'un complexe ternaire entre l'enzyme et ses deux substrats. Le premier substrat de DYRK1A est l'ATP, le second substrat est la protéine. La relation de Michaelis Menten pour un mécanisme ordonné, à l'état stationnaire, est la suivante :

$$V_i = \frac{V_{MAX} [ATP][Prot]}{[ATP][Prot] + K_M^{ATP} [Prot] + K_M^{Prot} [ATP] + K_M^{ATP} K_M^{Prot}}$$

La **Figure 11** représente de façon schématique la réaction catalysée par DYRK1A avec le formalisme de Cleland.

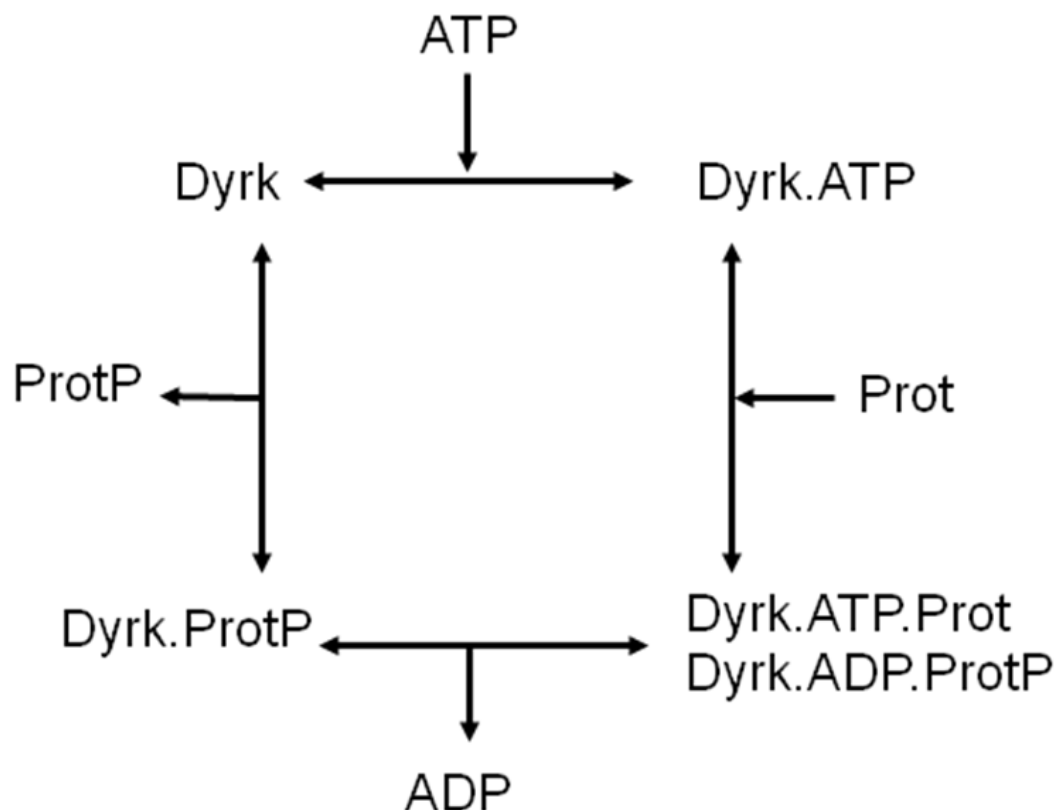


Figure 11
Schéma de la réaction catalysée par Dyrk1A

1.2.6 Régulation

La phosphorylation de la boucle d'activation de DYRK1A stabilise une conformation avec un positionnement approprié pour accommoder le substrat (pour revue Nolen et al, 2004). L'activité des kinases de la famille des DYRK dépend de la phosphorylation d'un résidu au sein d'un motif très conservé dans la boucle d'activation, situé entre les sous-domaines VII et VIII « Tyr319-X-Tyr321 » (Kentrup et al, 1996 ; Himpel et al, 2000 et 2001 ; pour revue Becker et Sippl, 2011). Cette autophosphorylation est constitutive et a lieu durant la synthèse de la protéine (Himpel et al, 2001 ; Lochhead et al, 2005). Des études de mutagenèse dirigée ont permis de conclure que l'activité de DYRK1A est dépendante de l'autophosphorylation de la Tyr en position 321, seul résidu à être phosphorylé (Himpel et al, 2001). Cette autophosphorylation est une caractéristique intrinsèque du domaine catalytique, et ne dépend d'aucun autre domaine ou facteur (Göckler et al, 2009). Le motif d'autophosphorylation et l'orientation de la Tyr 321 ressemblent à ceux de la Tyr185 des MAPK activées (Himpel et al, 2001). Ce mécanisme apparaît comme une caractéristique commune au groupe de kinase CMGC auquel DYRK1A appartient (Himpel et al, 2001 ; pour revue Becker et Sippl, 2011). Il a été observé également que deux résidus, la Tyr111 et la Ser 97, situés au niveau du domaine Nter, permettaient l'optimisation de l'autophosphorylation. Les DYRK activées phosphorylent leurs substrats seulement sur des résidus Ser/Thr et non sur des Tyr (Adayev et al, 2007).

Des études de mutagenèse dirigées sur des protéines recombinantes GST-DYRK1A- Δ C, délétées du domaine C terminal, ont permis de montrer que DYRK1A est une kinase Ser/Thr « proline et arginine dirigée ». DYRK1A phosphoryle ses substrats sur des résidus au sein d'une séquence consensus « Arg-Pro-X-Ser/Thr-Pro » très proche de celles que reconnaissent les MAPK, les kinases cycline dépendante ainsi que les GSK. La présence de la proline en P+1 est importante pour la phosphorylation de ces substrats (Himpel et al, 2000). La Tyr321 phosphorylée forme des liaisons avec deux Arg proches d'elle, Arg325 et Arg328 ce qui stabilise la structure comme cela a été observé par cristallographie aux rayons X (**Figure 12**) (pour revue Becker et Sippl, 2011). La déphosphorylation de la Tyr321 déstabilise la conformation active et conduit à la perte d'activité de DYRK1A (Himpel et al, 2001 ; Lochhead et al, 2005).

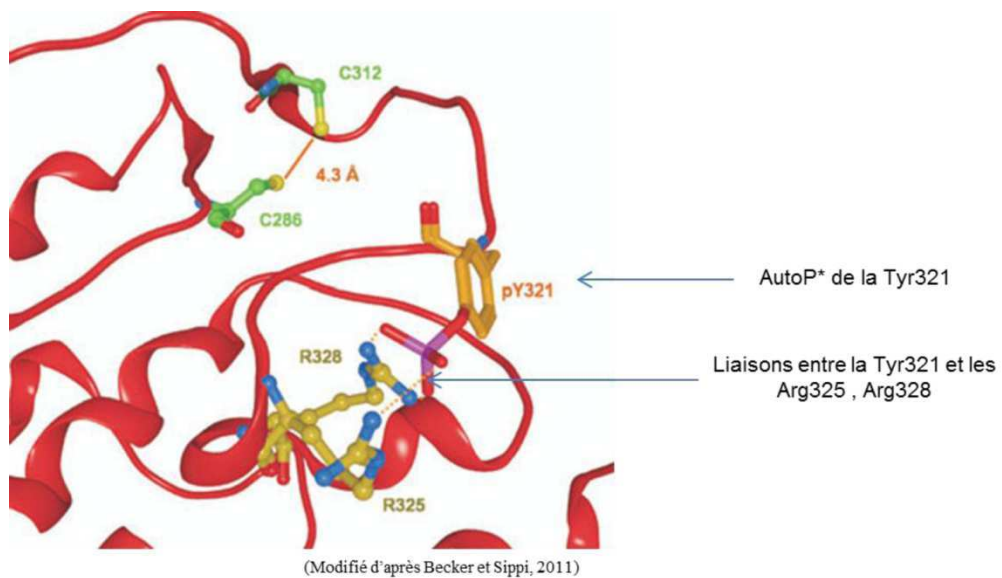


Figure 12
Site d'autophosphorylation de Dyrk1A (adapté d'après Becker et Sippl, 2010)

L'autophosphorylation de DYRK1A est constitutive, elle a lieu lors de la synthèse de la protéine. La structure tridimensionnelle obtenue par cristallographie aux rayons X du site d'autophosphorylation montre un pont disulfure intramoléculaire entre les groupements thiols des Cys312 et Cys286 conservés (en vert) et la distance de cette liaison est de 4.3 Å. Les Arg325 et Arg328 interagissent avec la Tyr321 phosphorylée par des liaisons hydrogènes

DYRK1A, malgré son autophosphorylation constitutive, n'est pas activée en permanence. Son activation dépend des types cellulaires au sein desquelles elle est présente et de facteurs susceptibles d'interagir avec elle. Ce sont ces interactions qui vont réguler l'activité de DYRK1A et donc certaines de ses fonctions qui sont gène-dosages et activités dépendantes (Arron et al, 2006 ; Gwack et al, 2006). Plusieurs mécanismes de régulation de la protéine DYRK1A et du gène commencent à être connus :

- Une interaction avec la protéine 14.3.3 permet de moduler l'activité de DYRK1A en augmentant son activité catalytique sans compromettre l'autophosphorylation de la Tyr321 (Alvarez et al, 2007). Le mécanisme n'est pas encore totalement connu mais, suite à l'interaction, a lieu une autophosphorylation du résidu Ser520 permettant de stabiliser le complexe (Kim et al, 2004 ; Alvarez et al, 2007). Ce mécanisme est spécifique à DYRK1A, en effet le résidu Ser520 n'est pas conservé chez les autres membres des DYRK (Alvarez et al, 2007).
- L'AP-4 ou activator protein 4 a été décrite comme un régulateur négatif de l'expression du gène DYRK1A dans les cellules non-neurales (Kim. MY et al, 2006).
- Dans des lignées de neuroblastomes SH-SY5Y, une augmentation du taux d'ARNm de DYRK1A est induite par le peptide A β (Kimura et al, 2007).
- La présence d'un élément potentiellement déstabilisant en 3'UTR « AUUUA » de l'ARNm de DYRK1A et de la région PEST de la protéine DYRK1A appuient l'hypothèse que l'expression de DYRK1A peut être sujette à de rapides changements *in vivo* (Kentrup et al, 1996).

1.3 Tests d'activité de DYRK1A

1.3.1 Test radioactif

Une méthode très largement employée pour étudier l'activité des kinases est basée sur l'utilisation d'ATP marqué radioactif comme donneur de phosphate et la détection par scintigraphie du phosphate incorporé dans les substrats protéiques ou peptidiques. Cette technique radiométrique est simple et appropriée pour la détection d'activité kinase de protéines avec une haute sensibilité. En revanche, elle dépend de l'utilisation d'isotopes radioactifs phosphates ^{32}P ou ^{33}P dont la demi-vie est courte. Les équipes de Himpel (Himpel

et al, 2000-2001), d'Adayev (Adayev et al, 2006a), de Kim (Kim, 2006), de Bain (Bain et al, 2007) et d'Alvarez (Alvarez et al, 2007) ont caractérisé les principales propriétés cinétiques de DYRK1A par cette méthode. L'utilisation du peptide substrat plutôt que des protéines entières a été privilégiée et il a fallu identifier les séquences consensus spécifiques des substrats phosphorylés par DYRK1A.

L'identification de ces séquences a été faite par alignement de séquences et/ou l'utilisation de modèles structuraux. Ainsi, Himpel et *col* (Himpel et al, 2000) ont mis en évidence d'une séquence consensus reconnue par DYRK1A « Arg-Pro-X-Ser/Thr-Pro ». Cette technique qui se révèle très sensible est une méthode de choix quant au dosage d'une activité kinase et à fortiori celle de DYRK1A. Cependant, elle est très contraignante par la nécessité d'avoir des locaux dédiés à l'utilisation de la radioactivité ainsi qu'au personnel formé. Elle est également très contraignante lorsque l'on veut faire des cinétiques car il n'est pas possible de faire une lecture continue.

1.3.2 Test ELISA

La méthode de l'ELISA directe en sandwich utilise des anticorps spécifiques permettant de distinguer les formes phosphorylées des formes non-phosphorylées des substrats des kinases (Yano et al, 1991 ; pour revue Olive, 2004 ; Lilienthal et al, 2010). Cette méthode est très sensible et permet de détecter une infime quantité de substrats phosphorylés en présence d'un excès de substrats non-phosphorylés. Elle a été développée et utilisée pour mesurer l'activité kinase endogène de DYRK1A dans des tissus cardiaques de souris (Lilienthal et al, 2010). La protéine Tau, connue pour être phosphorylée par DYRK1A (Woods et al, 2001 ; Ryoo et al, 2007), est utilisée comme antigène et des anticorps anti-phosphoTau sont couplés à la biotine. L'utilisation de la streptavidine permet une détection colorimétrique de la liaison anticorps-phosphoTau. Ce test s'est révélé opérationnel pour le dosage de protéines DYRK recombinantes et également de DYRK1A endogène issues de tissu cardiaque de souris. Cependant, il faut préalablement immunoprécipiter l'enzyme avant son dosage (Lilienthal et al, 2010). Cette technique simple d'utilisation, donne la possibilité d'utiliser un taux élevé d'ATP, contrairement aux méthodes radioactives. En revanche, cette technique ELISA est semi-quantitative et multi-étape.

1.3.3 Test IMAP™ (Molecular Devices)

L'IMAP™ par polarisation de fluorescence (FP) ou par transfert d'énergie par résonance de type Förster (TR-FRET) sont des méthodes non-radioactives, n'utilisant pas d'anticorps et permettant la mesure de l'activité d'une large variété de kinases, phosphatases et phosphodiesterases (Beasley et al, 2003 ; Tammy et al, 2003 ; Sharlow et al, 2008). La méthode est basée sur l'existence d'interactions à haute affinité entre un complexe contenant des métaux trivalents et des nanoparticules (M^{III}) et le groupement phosphate du peptide ou de la protéine phosphorylée (Ser- PO_4 , Thr- PO_4 , Tyr- PO_4 ou autres molécules). Le substrat (peptide ou protéine) est couplé à une fluorescéine (5FAM) puis incubé dans une solution contenant de l'ATP et l'enzyme d'intérêt permettant la phosphorylation du substrat par ajout d'un phosphate. L'addition du tampon IMAP (contenant M^{III}) stoppe la réaction catalytique, M^{III} se lie de façon covalente au phosphate $-PO_4$. Cette liaison est hautement polarisée. L'émission et l'absorption de l'onde est détectée par polarisation de fluorescence ou par TR-FRET puis analysée.

Les activités kinases des protéines DYRK1A humaine et Dyrk1A murine ont été analysées avec des substrats DYRKtides (Himpel et al, 2000 ; Woods et al, 2001) par IMAP FP (Molecular Devices, IMAP® assay profile : DYRK1A). La lecture de la plaque se fait à l'aide de la FlexStation 3 (Molecular Devices), cet appareil est un lecteur multimode permettant d'étudier les activités kinases sur des cellules vivantes en temps réel en détectant la fluorescence.

Le projet : développement d'un nouveau test DYRK1A par HPLC/UFLC afin de tester de nouvelles molécules à visées thérapeutiques

1.1 Mise au point d'un nouveau test kinase

Les tests d'activité kinases existants, radioactifs ou non, présentent tous des limites de détection et/ou de réalisation. La mise au point d'un nouveau test d'activité par RP-HPLC/UFLC sensible, spécifique, rapide et n'utilisant pas de radio-isotopes s'appliquant aux kinases, phosphatases et phosphodiesterases a été une étape importante de notre étude.

1.2 Test de nouveaux inhibiteurs *in vitro* et *ex vivo*

Grâce à ce nouveau test d'activité de DYRK1A, nous avons testé le potentiel inhibiteur de molécules synthétisées par l'équipe du Dr. R Dodd de l'Institut de Chimie des substances Naturelles (CNRS). Les structures de ces molécules qui sont actuellement soumises à une demande de brevet ne peuvent être divulguées dans ce manuscrit, nous présenterons toutefois les résultats (mécanisme d'inhibition et leur puissance inhibitrice (K_I)) obtenus pour les composés les plus intéressants.

2 Matériels et méthodes

2.1 Expression et purification de la DYRK1A de rat recombinante

Nous avons travaillé avec deux formes de DYRK1A recombinantes « taggées » en GST et en 6xHis : DYRK1A complète et DYRK1A-ΔC (**Figure 13**).

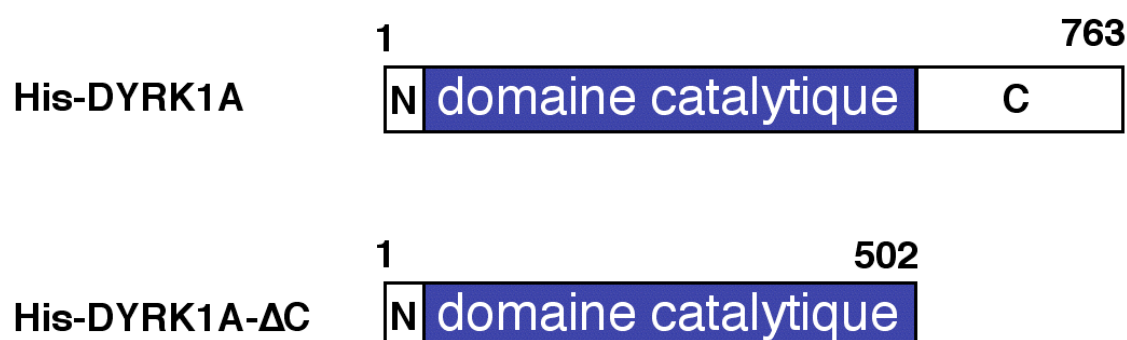


Figure 13
Les protéines recombinantes His-DYRK1A.

Schéma montrant les deux variants enzymatiques générés dans ce projet. His-DYRK1A correspond à l'enzyme complète. His-DYRK1A-ΔC correspond à l'enzyme déléetée de son domaine C-terminal.

2.1.1 Sous clonage

Le vecteur pKEN2 contenant l'ADNc de la DYRK1A de rat provient du laboratoire du Dr. Becker (Cf publication). L'ADN plasmidique (1μg) a été traité par 2.5 unités d'enzymes de restriction XhoI et BamHI (Biolabs) 1h30 à 37°C dans un volume total de 10 μl. En parallèle, la même quantité de vecteur pGEX 4T-2 (Pharmacia) a été traitée dans les mêmes conditions. Le vecteur pGEX 4T-2 permet la production de protéines de fusion constituées de la partie centrale de la glutathion S-transférase (GST) de *Schistosoma japonicum* en phase avec le produit de l'insert sous-cloné dans le vecteur. Les produits de digestion sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (2.5 %) en présence de bromure d'Ethidium (BET). La bande correspondant à l'ADNc codant DYRK1A, et celle correspondant au vecteur pGEX 4T-2 digéré sont découpées. L'ADN est ensuite extrait et purifié grâce au kit QIAquick

Gel Extraction Kit ® (QIAGEN). L'étape suivante de ligation met en jeu 50 ng de vecteur et 300 ng d'insert dans un volume total de 15 µl contenant le tampon de ligation et la ligase (Biolabs). Le mélange de ligation est maintenu 16 h à 16°C. Par la suite, des bactéries compétentes *E. Coli* XL1-Blue (100 µl) sont transformées par choc thermique (1 min 30 à 42 °C) avec les produits de ligation. Après culture à 37 °C dans 500 µl de milieu LB, les bactéries transformées sont étalées sur boîte de Pétri contenant de l'ampicilline (100 µg/ml d'agar). Les clones recombinants sont sélectionnés après préparation des plasmides (kit QIAprep Miniprep® QIAGEN) et vérification de la présence de l'insert par digestion enzymatique. Finalement, le vecteur recombinant pGEXT 4T-2- DYRK1A purifié est utilisé pour transformer la souche *E. Coli* BL21 (DE3) comme décrit ci-dessus.

De la même façon, nous avons cloné dans le vecteur pET28 permet d'obtenir une étiquette ou « tag » de 6 histidines en N-terminal de la protéine dont l'ADNc.

2.1.2 Culture

Les bactéries *E. Coli* BL21 (DE3) transformées par le vecteur recombinant pGEX 4T-2-DYRK1A sont cultivées dans 6 litres de milieu LB [(Bactotryptone 1 % (m/v), 0.5 % d'extraits de levure (m/v), 1% NaCl (m/v) pH 7] contenant de l'ampicilline (100 µg/ml final) à 37°C. Lorsque l'absorbance à 600 nm atteint 0,5 unité (au bout de 2 à 3h), la production de protéine recombinante GST-DYRK1A est induite par de l'isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG, 500 µM final) pendant 8 heures à 20°C et sous agitation. Le culot bactérien est obtenu par centrifugation (6000 g ; 10 minutes) et conservé à -80°C. La culture des clones Histag DYRK1A se fait de la même façon mais en présence de 30 µg/ml de kanamycine comme antibiotique de sélection.

2.1.3 Extraction, purification

Les culots (à partir de 500 ml de culture) sont resuspendues dans 20 ml de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8, 150 mM NaCl (tampon de lyse) contenant du lysozyme (1 mg/ml) et un mélange d'inhibiteurs de protéases (Roche). Après incubation à 4 °C pendant 30 min, le Triton X-100 (0.2 %) est rajoutée ainsi que de la DNase I (Sigma, 5 µg/ml). Après 30 minutes sous agitation en glace, le lysat subit une sonication (puissance 20w avec 20 cycles on/off d'une durée respectivement de 8 sec et 30 sec) puis une centrifugation (12000 g, 30

min). Le surnageant est alors incubé avec 200 µl de billes de glutathion-agarose (Sigma) pendant 1 h à 4°C. Les billes sont ensuite lavées 2 fois avec le tampon de lyse contenant du Triton X-100 (0.2 %) puis 2 fois en l'absence de Triton X-100. La protéine de fusion GST-DYRK1A est éluée grâce à 3 incubations successives (15 min, 4°C) avec 250 µl de tampon Tris-HCl 50 mM pH8, 1 mM EDTA contenant 10 mM de glutathion réduit. La protéine purifiée est ensuite dialysée contre du tampon Tris-HCl 25 mM pH 7.5, 1 mM EDTA, puis stockée à -80 °C en présence de glycérol (10% final).

La procédure est similaire pour extraire l'His-DYRK1A. Mais le lysat est incubé avec 1.5 ml de résine de Nickel Agarose en présence d'une concentration finale de 10 mM d'imidazole pendant 2h à 4°C. La résine est ensuite introduite dans une petite colonne et lavée successivement avec du tampon de lyse contenant 0.2 % de Triton X-100 puis avec du tampon de lyse contenant 30 mM d'imidazole (concentration finale). L'His-DYRK1A est ensuite éluée à l'aide du tampon de lyse comportant 300 mM d'imidazole (concentration finale). La protéine His-DYRK1A ainsi purifiée est réduite grâce au DTT (10 mM final) pendant 10 min à 4°C puis est soumise à une dialyse contre un tampon Tris-HCl 25 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM.

A chaque étape de la purification, les échantillons sont mis à migrer sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE), la concentration protéique est également déterminée grâce à la méthode de Bradford, la droite étalon étant obtenue grâce à l'albumine de sérum bovin (BSA).

2.1.4 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant (SDS-PAGE) est réalisée selon la technique décrite par Laemmli (Laemmli, 1970) avec des gels à 10 % d'acrylamide. Le tampon de dépôt est composé de Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8 contenant 2 % de SDS (m/v), 5 % de 2-mercaptoéthanol (v/v), 10 % glycérol (v/v) et 0.002 % de bleu de bromophénol (m/v). Les protéines sont dénaturées par chauffage 3 minutes à 100°C dans ce même tampon. La migration s'effectue à 180 V pendant 1 heure. Après électrophorèse, les protéines sont révélées par coloration du gel dans une solution de bleu de Coomassie R-250 0.2 % (m/v), 10 % d'acide acétique (v/v) et 50 % d'eau pendant 1 heure. La décoloration est assurée par une solution d'acide acétique 10 % et méthanol 30 % (v/v).

2.1.5 Immunoélectrotransfert (Western-blot)

Les protéines séparées par SDS-PAGE sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Pharmacia). L'électrotransfert est effectué à une intensité constante de 200 mA pendant 1 heure. La membrane est ensuite saturée pendant 1 heure à l'aide d'un tampon Tris 25 mM pH 8.2, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween-20 (Tampon TST) contenant 5 % de lait écrémé (m/v). L'incubation avec l'anticorps primaire spécifique se déroule dans le tampon TST contenant 1 % de lait écrémé (m/v) à température ambiante. Cette incubation est suivie de lavages avec le même tampon. Les complexes antigène-anticorps sont révélés après incubation avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Cette incubation est suivie de lavages avec le même tampon. La révélation est réalisée par chimioluminescence en utilisant le système de détection ECL (Pierce).

2.2 HPLC

2.2.1 Principe de l'HPLC

La chromatographie liquide à haute pression (HPLC) est une méthode de séparation des constituants d'un mélange. Un fluide ou « phase mobile » parcourt une colonne ou « phase stationnaire ». Le mélange à séparer, dilué dans la phase mobile, est injecté à l'entrée de la colonne. Les constituants du mélange injecté se déplacent moins vite que la phase mobile dans la colonne, générant un phénomène appelé rétention. Les solutés sont retenus suivant leur propriété physico-chimique par la colonne et sont élués les uns après les autres. A la sortie de la colonne, un détecteur permet d'enregistrer et d'obtenir un signal en fonction du temps. L'enregistrement, appelé chromatogramme, est caractérisé par les temps de rétention de chaque soluté. Le temps de rétention (temps au bout duquel un composé est élué dans la colonne et détecté) caractérise un composé. L'amplitude des pics, ou l'aire sous les pics, et le signal de la ligne de base (signal constant correspondant à la phase mobile seule) permettent de mesurer la concentration de chaque soluté présent dans le mélange initialement injecté.

2.2.2 Analyses qualitatives

Le temps de rétention (en secondes ou en minutes) est une caractéristique de chaque produit dans les conditions d'expériences. La comparaison des temps de rétention (t_r) de deux produits définit le facteur de sélectivité α entre deux produits, l'efficacité d'une colonne (mesurée en nombre de plateaux théoriques (n)) et la résolution de la colonne pour la séparation de deux produits (R) :

$$\alpha = (t_r \text{ du produit 2}) / (t_r \text{ du produit 1})$$

Si $\alpha = 1$: les pics coïncident, si $\alpha = 1,05$: la séparation est possible.

$$n = (t_r / \text{écart type})^2$$

$$R = 2 \times ((t_{r2} - t_{r1}) / (w_1 + w_2))$$

Où w est la largeur du pic à la base (en unité de temps). Si $R > 1$ la résolution est bonne, si $R < 1$ la séparation est mauvaise.

2.2.3 Analyses quantitatives

L'aire des pics du chromatogramme est proportionnelle à la concentration ou à la quantité de produit analysé : aire = f ([produit]). Une courbe d'étalonnage est réalisée pour un volume d'injection constant.

2.2.4 Le matériel

Le matériel HPLC est de marque Shimadzu, c'est une chaîne Prominence de série 20A. Plusieurs éléments composent cet appareil :

Un réservoir de solvant, qui contient une grande quantité de phase mobile, des flacons d'éluateurs (ou solvants) de polarités différentes afin de réaliser des gradients d'élution.

- Deux pompes binaire haute pression (pompe A : solvant aqueux et pompe B : solvant organique). Ce système permet de travailler en mode isocratique (utilisation du même éluant tout le long de l'analyse) ou en mode gradient (variation de la concentration des constituants du mélange d'éluateur).

- Un injecteur automatique : le système d'injection est composé d'une pompe de dosage à haute résolution et d'un système d'injection direct permettant de ne pas perdre d'échantillon et d'en utiliser de petits volumes (allant de 0,5 µl à 100 µl) avec une vitesse de 10s pour 10 µl d'injection. Le système d'injection est accompagné d'un changeur de plaque, permettant de traiter plusieurs échantillons.

- Un four qui permet de chauffer la colonne

- Les détecteurs : deux types de détecteurs composent le LC-20A : un détecteur UV-visible photodiode array (PDA). Le détecteur UV-visible permet de mesurer le spectre d'absorption allant de 190 à 900 nm en temps réel à la sortie de la colonne. Un détecteur fluorescence à double canal qui permet la lecture de la fluorescence après excitation.

2.2.5 Les colonnes

Les colonnes constituent la phase stationnaire du système. Elles sont à polarité inversée majoritairement composée de silice greffées par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C₈ et C₁₈). C'est une phase apolaire qui est en contact d'un éluant polaire (ACN, MeOH, H₂O ...) permettant aux composés polaires d'être élués en premier. La phase mobile permet le transport du mélange à éluer. Les interactions plus ou moins fortes entre la phase mobile et la phase stationnaire se répercutent sur les temps de rétention des composés du mélange. La phase stationnaire est très peu polaire permettant de jouer sur la polarité de la phase mobile et donc d'agir sur les facteurs de rétention des différents composés.

Deux types de colonnes C₈ ont été utilisés se distinguant par leur granulométrie des particules de silice greffée (5 µm et 2.1 µm). Plus le diamètre est petit, plus la courbe de pression va être importante et les temps de rétention vont diminuer. En revanche il faut des appareillages pouvant supporter des pressions jusqu'à 600 bars, ce qui est le cas avec le LC20A.

2.3 Protocole de dosage par HPLC

2.3.1 Dosage de l'activité

La réaction de dosage de l'activité de DYRK1A se fait dans un volume final de 100 μ L. La réaction débute (t_0) lorsque l'enzyme et les deux substrats (ATP et peptide) sont mis en présence. La réaction est stoppée par ajout de 100 μ L d'une solution de perchlorate à 15%. Pour effectuer une étude de cinétique il faut donc plusieurs solutions correspondant à différents temps d'arrêt. Ce protocole s'adapte parfaitement en plaque 96 puits type ELISA, après centrifugation de la plaque le surnageant peut directement être injecté dans notre système HPLC.

Le tampon de dosage est composé de 50 mM Tris-HcL (pH 7,4) ; 10 mM DTT ; 0,1 mM EGTA et 10 mM $MgCl_2$. Le peptide substrat utilisé (FAM-Peptide) a pour séquence $_5FAM-KKISGRLSPIMTEQ-NH_2$. Il s'agit d'une séquence consensus, issue des données d'alignements de protéines qui sont phosphorylées par DYRK1A. Le peptide qui est greffé sur sa partie C_{ter} par un chromophore (la fluorescéine-5-FAM) a été synthétisé par la société Genosphere avec comme consigne un degré de pureté supérieur à 95% en HPLC (détection par fluorescence). Les concentrations en peptides généralement utilisées sont comprises entre 5 et 120 μ M. Enfin le second substrat est l'ATP (HPLC grade) et sa concentration finale au cours du dosage est classiquement comprise entre 50 et 1000 μ M.

2.3.2 Méthode HPLC

La méthode utilisée a été optimisée et permet une séparation correcte du substrat et du produit en moins de 3.5 minutes. C'est une méthode isocratique avec un débit de 1,5 ml/min avec 75% de solution aqueuse (A) : Eau 0,1% TFA et 25% de solution organique (B) : Acétonitrile 0,1% TFA. La température du four est réglée à 40°C. Il y a en sortie de colonne deux détecteurs en ligne, le PDA et le détecteur de fluorescence dont les longueurs d'excitation et d'émission sont réglés pour une détection optimale du chromophore greffé sur le peptide ($\lambda_{exc} = 485$ nm et $\lambda_{em.} = 530$ nm).

2.4 Inhibition de l'activité DYRK1A

2.4.1 Protocole

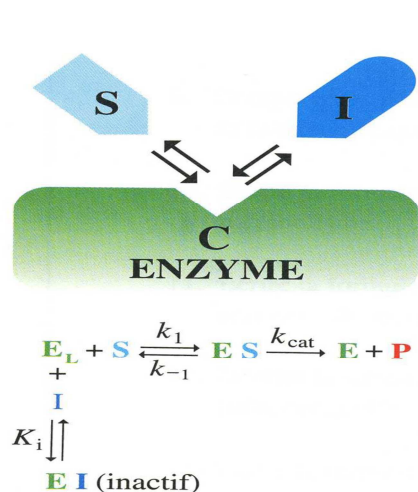
Tous les inhibiteurs que nous avons testés sont de type réversible. Ils sont donc testés en condition de dosage. Dans la majorité des cas, des solvants de solubilisation (DMSO) pour les solutions mères des inhibiteurs ont été nécessaires et le contrôle de 100% d'activité a alors été réalisé dans les mêmes conditions en concentration finale de solvant organique.

2.4.2 Modèle mathématiques

La détermination du mécanisme d'action a été réalisée suivant deux modèles très classiques pour les inhibiteurs de type réversible :

- Inhibition de type compétitive
- Inhibition de type non compétitive

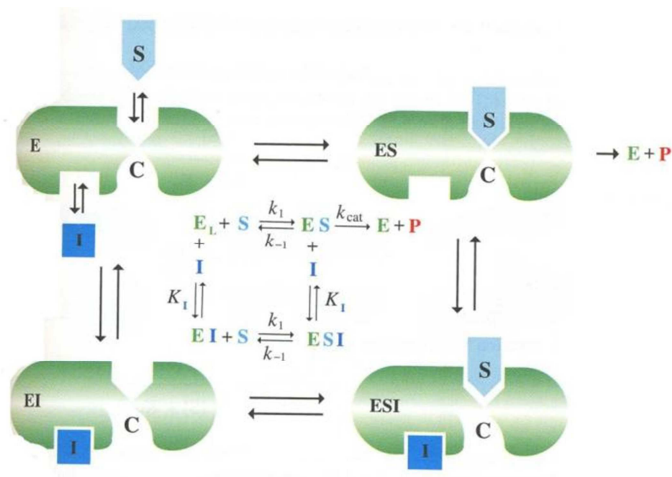
Les deux modèles sont représentés dans les **Figures 14 et 15**. (Schéma cinétique et équations cinétique associées). Des caractérisations de types d'inhibition compétitive (**Figure 14**) et non compétitive (**Figure 15**) ont été réalisées vis à vis des deux substrats :



$$V_i = \frac{V_{MAX}[S]}{K_M^{app} + [S]}$$

$$K_M^{app} = K_M \left(\frac{K_I + [I]}{K_I} \right)$$

Figure 14
Inhibition compétitive



$$V_i = \frac{V_{MAX}^{app} [S]}{K_M + [S]}$$

$$V_{MAX}^{app} = V_{MAX} \left(\frac{K_I}{K_I + [I]} \right)$$

Figure 15
Inhibition non compétitive

3 Résultats

3.1 Production des enzymes recombinantes

3.1.1 Sous clonage

Nous n'avons eu aucune difficulté pour sous cloner DYRK (Full et ΔC) dans les deux plasmides d'expression PGEX (GST) et pet28 (HisTagg). Le contrôle de séquence n'a montré aucune mutation sur l'ensemble des constructions.

3.1.2 Culture et extraction

Les vecteurs d'expression ainsi obtenus sont utilisés dans la souche *E. Coli* BL21pLys pour produire les protéines recombinantes, celles-ci seront ensuite purifiées selon les méthodes mises au point et utilisées au laboratoire. Plusieurs paramètres ont été modifiés pour optimiser la production de protéines de fusion essentiellement dans la phase de culture des bactéries. Les principaux paramètres ont été la concentration d'inducteur (IPTG), le temps et la température d'induction. La qualité de la production de DYRK1A est vérifiée par SDS-Page et Western blot. De façon systématique, la production de la forme tronquée de DYRK1A est bien meilleure que la version complète quelles que soient les conditions et l'étiquette (His et GST). La **Figure 16** représente la migration de la production de la protéine His-DYRK1A- ΔC en coloration au bleu de Coomassie pour les conditions optimales (100 μM IPTG pendant 18h à 20 °C). L'évaluation au bleu de Coomassie révèle un degré de pureté supérieure à 95 %.

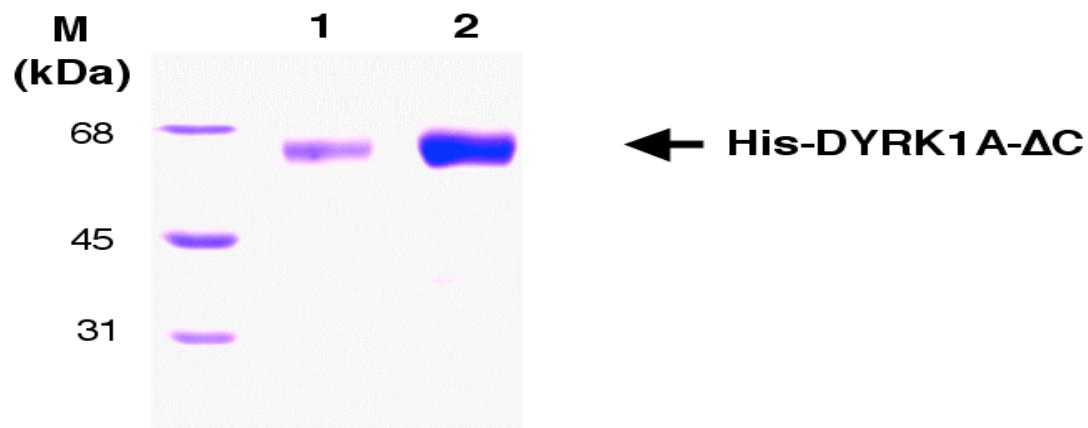


Figure 16
Purifications des protéines recombinantes

Coloration au bleu de Coomassie de l'éluat à 300 mM d'imidazole de His-DYRK1A-ΔC. Les pistes 1 et 2 contiennent environ 1 µg et 10 µg de protéine.

De la même façon, la qualité des protéines est évaluée en Western blot (**Figure 17**). L'utilisation d'anticorps anti-6xHis (1/10000^{ème}) (**Figure 17A**) et d'anticorps anti-DYRK1A (1/2000^{ème}) (**Figure 17B**) révèlent la présence d'une bande unique et de poids moléculaire correspondant à celui des protéines recombinantes, confirmant ainsi la pureté de la préparation de l'identité de la protéine produite.

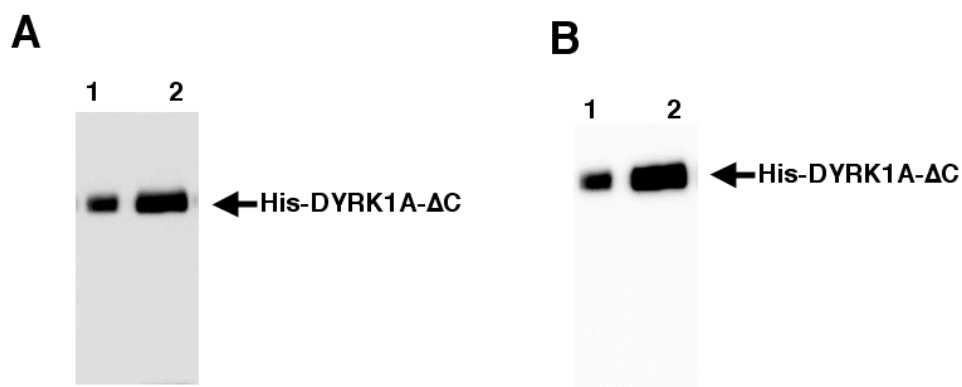


Figure 17
Vérification de la qualité des protéines recombinantes

Western-blot des éluats à 300 mM d'imidazole (respectivement 1 et 10 μ g pour les pistes 1 et 2) de His-DYRK1A- Δ C. Des anticorps monoclonaux anti-6xHis 1/10000^{ème} (A) et anti DYRK1A 1/2000^{ème} (B) ont été utilisés.

Concernant la production en Tagg GST des résultats similaires ont été obtenus pour la forme tronquée. En revanche, la préparation des protéines recombinantes de la forme complète s'est avérée plus compliquée que prévu, en particulier en raison de la présence de nombreux contaminants. Cependant, d'après la littérature, l'utilisation du seul domaine catalytique de l'enzyme DYRK1A s'avère suffisante pour cribler des inhibiteurs et/ou étudier son activité kinase, nous avons donc utilisé cette forme pour la mise au point du test kinase par HPLC.

3.2 Test d'activité de DYRK1A.

3.2.1 Mise au point

3.2.1.1 Gamme étalon substrat peptide

Le FAM-Peptide synthétisé par Genosphere a été testé par HPLC suivant les conditions décrites dans la section Matériel et méthodes. La **Figure 18** représente le chromatogramme en détection par fluorescence ($\lambda_{exc} = 485$ nm et $\lambda_{em} = 530$ nm). On observe bien un pic majoritaire (> 95%) avec un temps de rétention de 2,8 minutes (**Figure 18**).

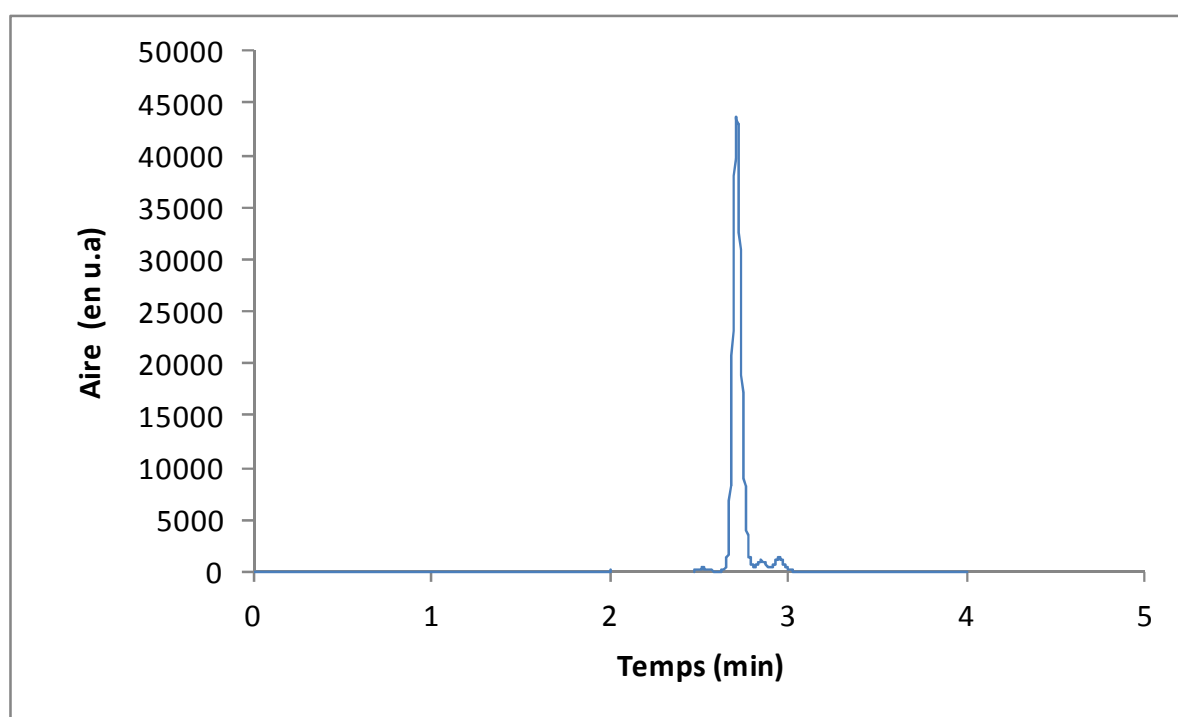


Figure 18 :
Chromatogramme du FAM-peptide en détection par fluorescence

Chromatogramme HPLC d'une solution de 30 μ M de $_5$ FAM-KKISGRLSPIMTEQ- NH₂ dont la détection se fait par fluorescence ($\lambda_{exc} = 485$ nm et $\lambda_{em} = 530$ nm).

Une série d'injection de solutions peptide à différentes concentrations permet de tracer la gamme étalon (**Figure 19**) qui doit être linéaire d'après la relation de Beer Lambert (pour l'absorbance).

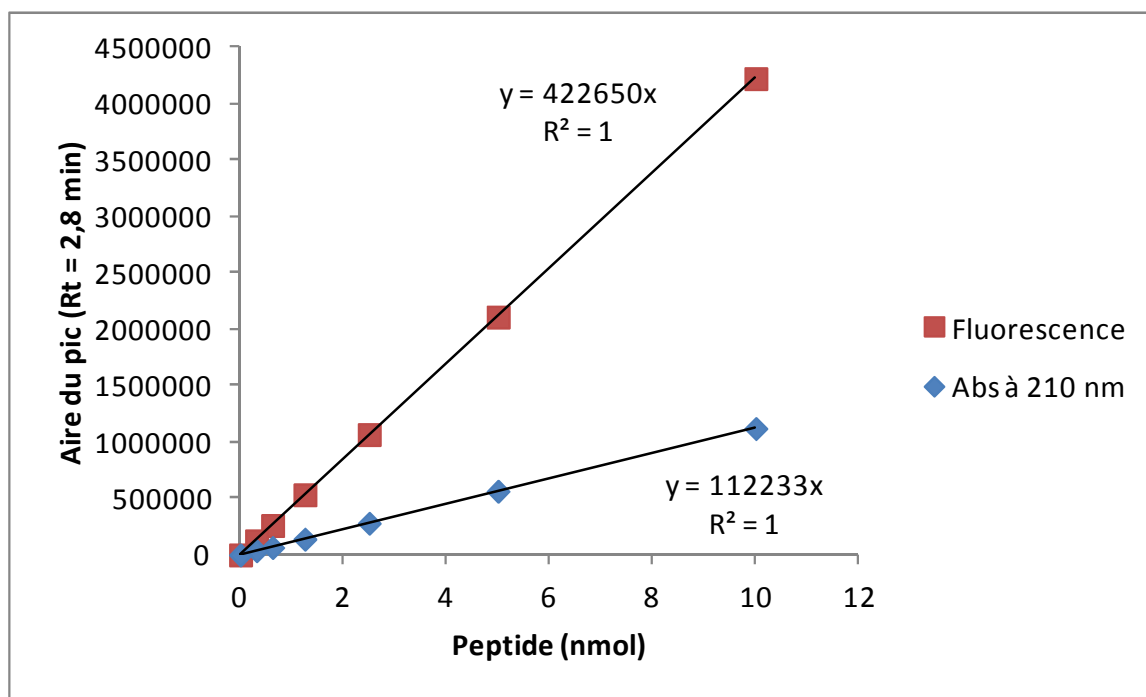


Figure 19 :
Gamme étalon du substrat FAM-peptide

On obtient une relation linéaire jusqu'à au moins une quantité de 10 nmol de peptide (soit 500 μ M). Le facteur de proportionnalité (pente de la droite) entre l'aire du pic et la quantité de peptide permet la conversion entre l'aire et la quantité de peptide. En faisant l'approximation que la phosphorylation ne modifie pas les propriétés spectroscopiques du peptide, cette courbe étalon peut également être utilisée pour calculer des quantités de produits formés. L'utilisation d'un groupement FAM sur le peptide permet une meilleure détection de celui-ci d'un facteur 4 environ.

3.2.1.2 Détermination des vitesses initiales (v_i)

Pour mesurer des vitesses en conditions d'état stationnaire de la réaction (vitesses initiales, v_i) il est nécessaire que la formation du produit soit un processus linéaire au cours du temps. La **Figure 20** représente la superposition des chromatogrammes issus de la réaction enzymatique à différents temps (0 à 15 minutes). Le pic substrat (très majoritaire) est quasiment constant au cours de la réaction ; en revanche on observe, au niveau du temps de rétention du produit, l'apparition d'un pic qui augmente avec le temps de réaction. Cette

augmentation est quantifiée par intégration de l'aire sous la courbe : la représentation de l'aire en fonction du temps de réaction doit être linéaire dans les conditions d'état stationnaire. Le calcul de la pente définit la V_i de la réaction. Cette vitesse initiale est dépendante des conditions expérimentales (concentration de substrats, d'enzymes, températures).

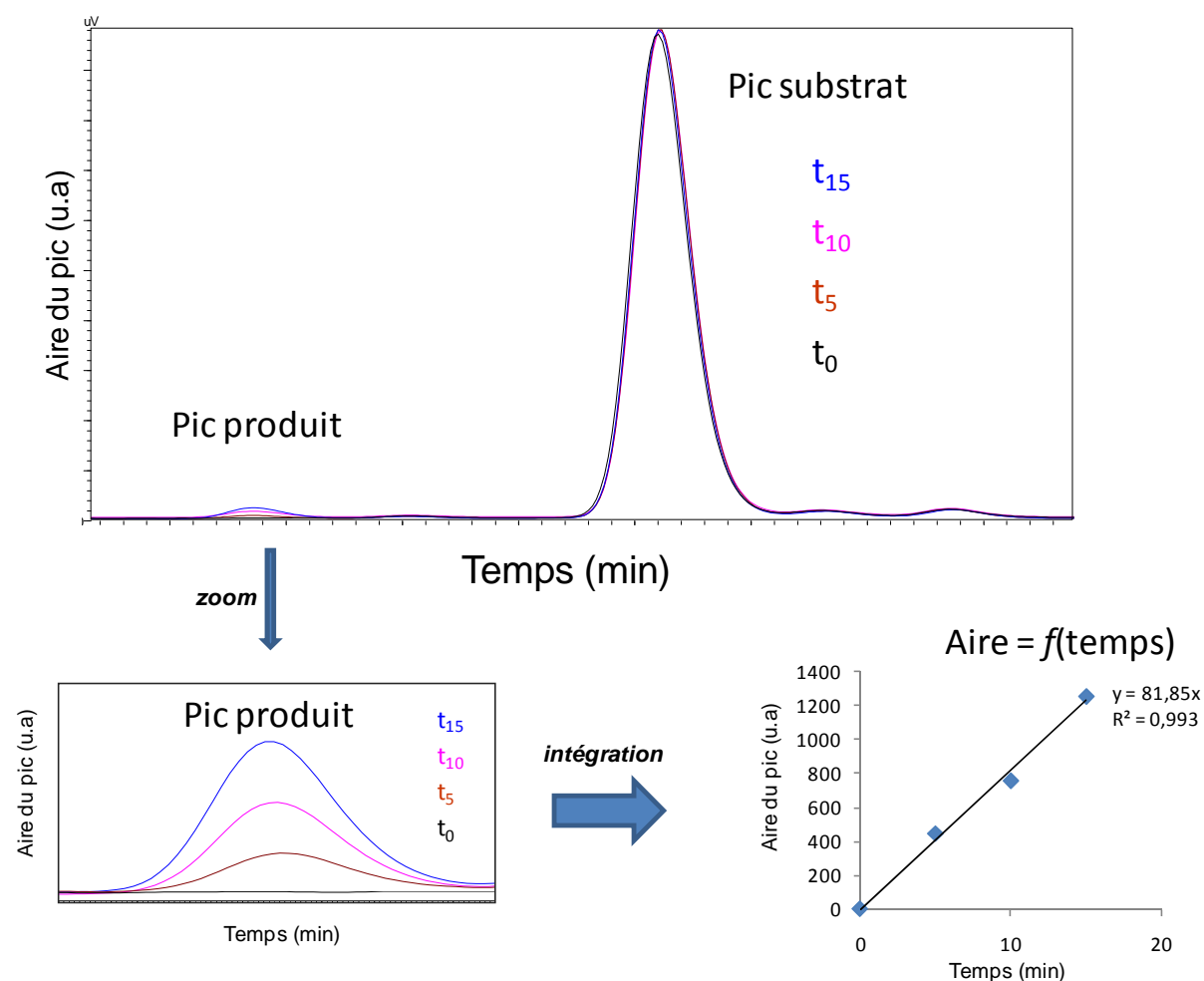


Figure 20
Analyse UFLC et cinétique de phosphorylation du peptide substrat par His-DYRK1A- Δ C

3.2.2 Détermination des paramètres cinétiques apparents

Pour valider notre test, nous avons déterminé les paramètres cinétiques apparents de la réaction catalysée par DYRK1A. Pour cela, nous avons mesuré des v_i en faisant varier la concentration en enzyme, le traitement de donnée permet de tracer la représentation d'Ackermann Potter (v_i en fonction de la concentration d'enzyme) et donne accès à la constante de vitesse de la réaction catalytique. En faisant varier la concentration en substrats

(ATP et Peptide), le traitement des données par la représentation de Michaelis-Menten donne accès aux constantes de Michaelis apparentes ($K_{M_{app}}^{ATP}$ et $K_{M_{app}}^{Pep}$).

3.2.2.1 Mesure de v_i en fonction de la concentration d'enzyme

Afin de vérifier le comportement cinétique Michaélien de la réaction enzymatique, les v_i de la réaction sont déterminées pour différentes concentrations en DYRK1A (0 à 8 nM) et avec des concentrations constantes en substrats ([ATP] = 1 mM et [Peptide] = 60 μ M). Dans toutes les conditions expérimentales testées la quantité de produit formé augmente de façon linéaire avec le temps de réaction. La représentation d'Ackermann Potter est présentée **Figure 21**.

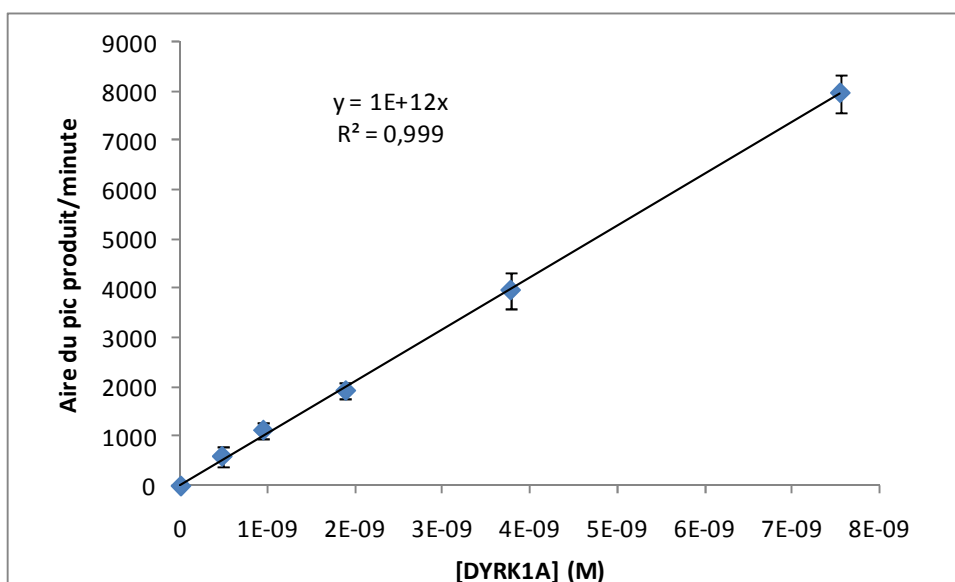


Figure 21
Représentation d'Ackermann Potter

L'obtention d'une droite est en accord avec le modèle cinétique Michaélien classique. La pente de cette droite permet de calculer la constante de vitesse observée (k_{obs}) de la réaction qui est dépendante des conditions expérimentales.

3.2.2.2 *Mesure de v_i en fonction de la concentration en substrat*

Les mesures de v_i à différentes concentrations en substrats permettent de déterminer les constantes de Michaelis apparentes pour les deux substrats (ATP et Pep = peptide) ; en effet l'équation de Michaelis pour un mécanisme à deux substrats peut s'écrire avec les paramètres apparents de la façon suivante :

$$V_i = \frac{V_{\text{MAX}}^{\text{app}} [\text{ATP}]}{K_{M_{\text{app}}}^{\text{ATP}} + [\text{ATP}]} \qquad V_i = \frac{V_{\text{MAX}}^{\text{app}} [\text{Pep}]}{K_{M_{\text{app}}}^{\text{Pep}} + [\text{Pep}]}$$

La **Figure 22** illustre ce comportement cinétique Michaélien de DYRK1A. La régression non linéaire sur le modèle d'une hyperbole équilatère permet d'obtenir des coefficients de corrélation très proches de 1.

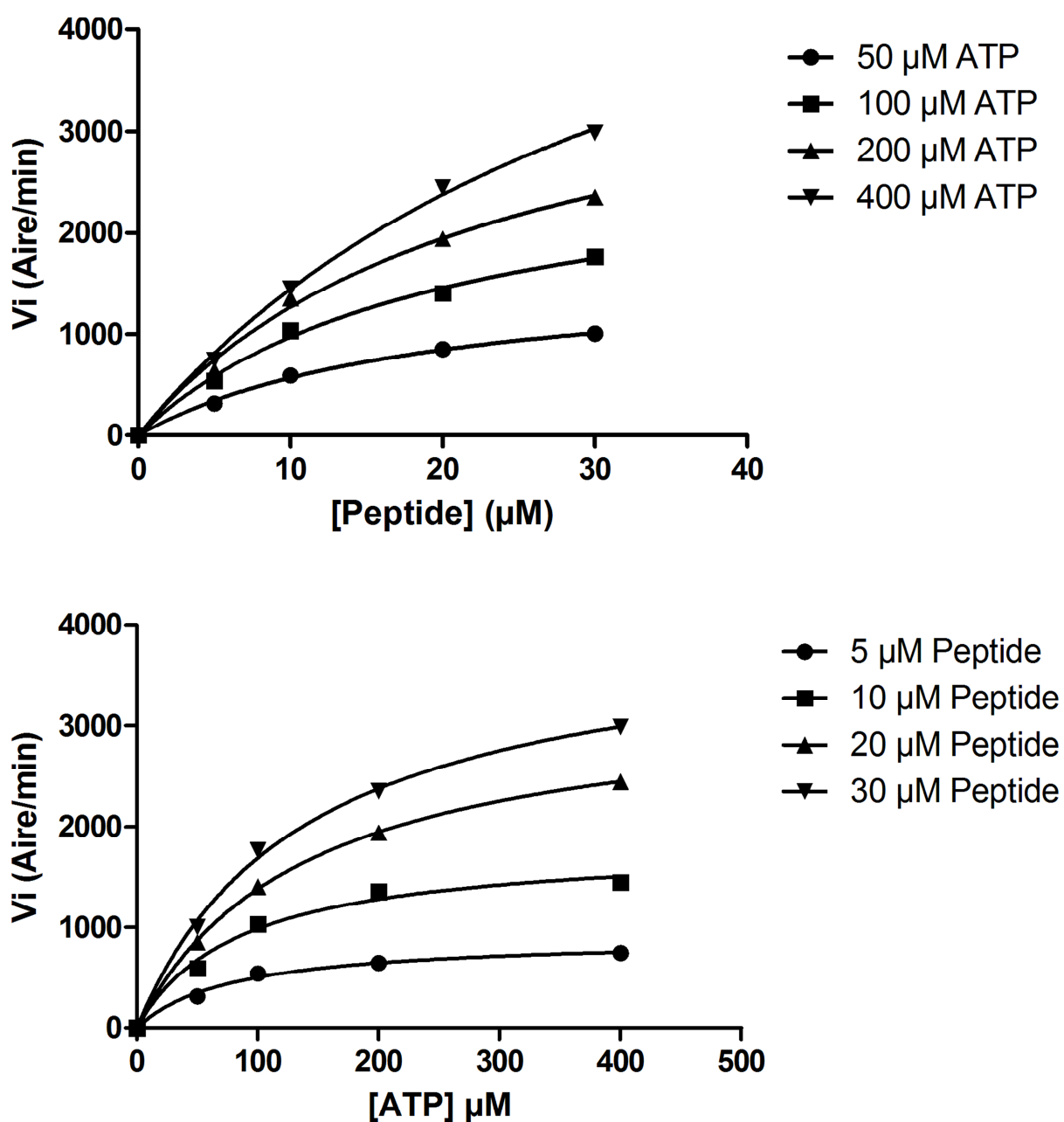


Figure 22

Représentation de Michaelis-Menten

V_i en fonction de la concentration en peptide (abscisse) et en ATP (courbes indépendantes de 50 à 400 μM)
 V_i en fonction de la concentration en ATP (abscisse) et en peptide (courbes indépendantes de 5 à 30 μM)

Les paramètres cinétiques apparents obtenus pour une concentration de DYRK1A à 4 nM (soit environ 25 ng) sont consignés dans le tableau suivant :

[ATP] (μM)	$V_{MAX_{app}}$ (pmol/min)	$K_{M_{app}}^{Pep}$ (μM)
50	3,9	19,1
100	6,8	20,2
200	9,9	23,2
400	15,8	36,5

[Peptide] (μM)	$V_{MAX_{app}}$ (pmol/min)	$K_{M_{app}}^{ATP}$ (μM)
5	2,1	79,3
10	4,3	85,1
20	7,8	139,3
30	9,5	140,3

Les paramètres cinétiques vrais (**Tableau ci-dessus**) sont calculés à partir de la relation de Michaelis Menten pour un mécanisme ordonné (Cf. Introduction).

	K_M (μM)		k_{cat} (min^{-1})
	ATP	Peptide	
DYRK1A	80 ± 12	32 ± 4	24 ± 2

3.3 Inhibition de DYRK1A

3.3.1 L'Harmine

L'harmine est un inhibiteur de DYRK1A, bien caractérisé dans la littérature. C'est un inhibiteur réversible de type compétitif vis à vis de l'ATP et non compétitif vis à vis du substrat protéine et/ou peptide. Nous avons utilisé notre test d'activité DYRK1A pour déterminer si nous retrouvions les propriétés d'inhibition de l'Harmine. La **Figure 23** représente l'activité (normalisée par celle en absence d'inhibiteur et exprimée en pourcentage) en fonction de la concentration d'harmine, pour deux concentrations d'ATP. L'activité de DYRK1A diminue en fonction de la concentration d'harmine avec une IC_{50} de $0.2 \mu\text{M}$ et 1.06

μM pour 50 et 1000 μM d'ATP respectivement. L'augmentation de la concentration d'ATP ne modifie pas la forme de la courbe mais la décale. Nos résultats confirment que l'harmine est un inhibiteur de l'activité de DYRK1A.

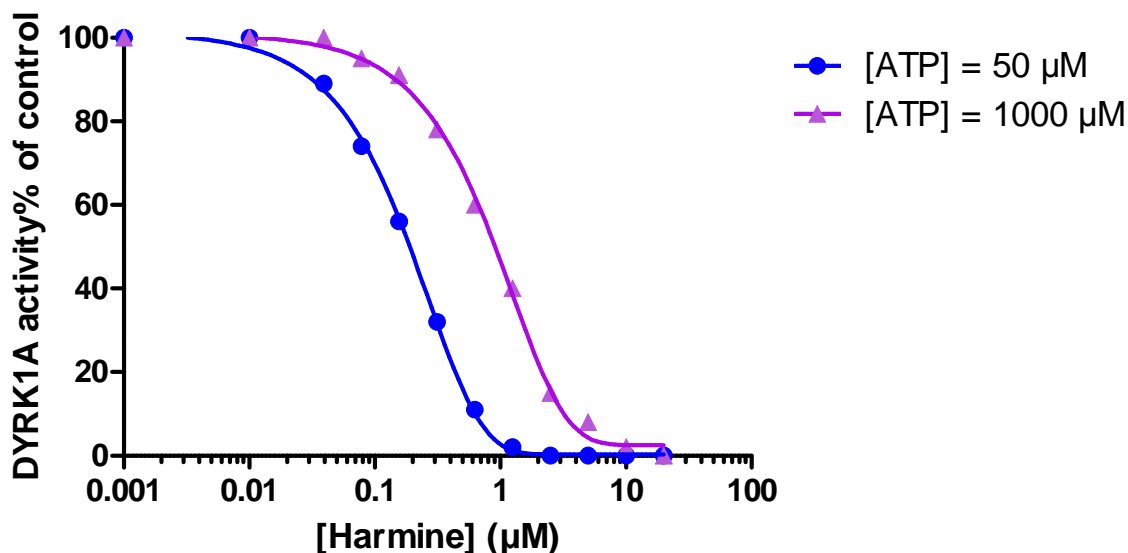


Figure 23
Inhibition de l'activité DYRK1A par l'Harmine

Activité normalisée de DYRK1A en fonction de la concentration d'Harmine (abscisse) pour deux concentrations d'ATP (courbes indépendantes 50 et 1000 μM)

Pour déterminer le mécanisme d'inhibition, nous avons réalisé des expériences d'inhibition par l'Harmine (de 50 à 500 nM) en faisant varier la concentration des deux substrats ATP de 50 à 400 μM et Peptide de 5 à 30 μM . Les résultats obtenus sont représentés en déterminant v_i en fonction de différentes concentrations en substrats. Nous avons utilisé deux types de modèles mathématiques (Cf. Matériels et méthodes) sur l'ensemble des résultats expérimentaux de l'inhibition par l'Harmine pour chacun des substrats. Le Logiciel Graph Pad Prism5 a été utilisé pour effectuer les régressions non linéaires, il intègre les modèles classiques d'inhibition d'une enzyme Michaelienne. La **Figure 24** représente les données de Michaelis-Menten ainsi que les régressions non linéaires obtenues avec les deux modèles retenus (compétitif et non compétitif). Les courbes en bleu sont celles qui ont été obtenues avec les meilleurs coefficients de corrélation, tandis que celles en rouge sont plus éloignées du modèle théorique.

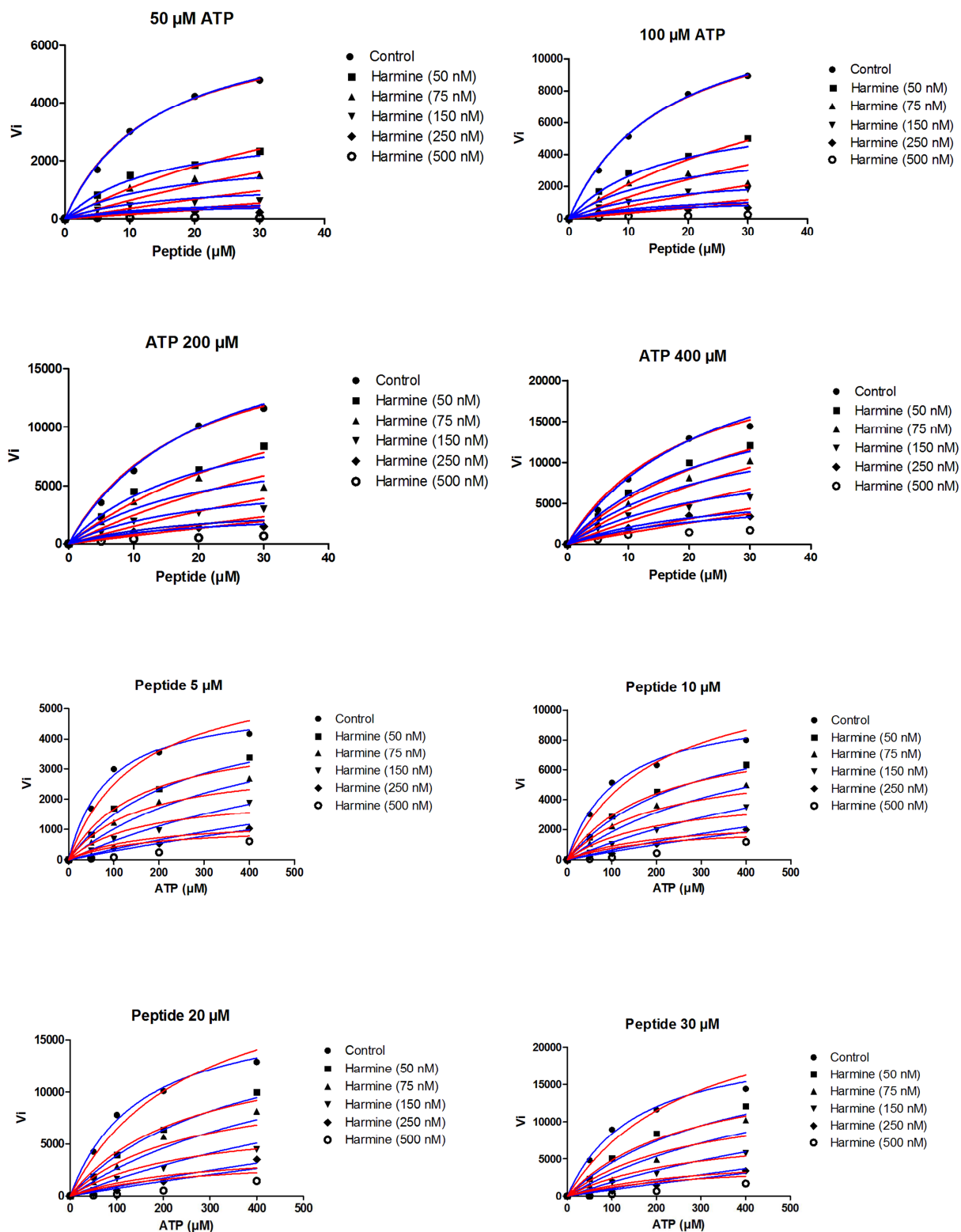


Figure 24
Cinétiques d'inhibition de l'Harmine sur l'activité DYRK1A

3.3.2 Criblage d'inhibiteurs

En collaboration avec l'équipe du Dr. Robert Dodd (Institut de Chimie des Substances Naturelles du CNRS), spécialisée dans la synthèse organique, nous avons criblé des dérivés hétérocycliques azotés de faibles poids moléculaires comme inhibiteurs potentiels de DYRK1A. Sur la base de la structure de l'Harmine et d'une étude de modélisation moléculaire, l'équipe de R. Dodd a synthétisé une quarantaine de composés, ils ont tous été testés quant à leur potentiel inhibiteur de l'activité DYRK1A. Les structures et formules chimiques de ces molécules ne peuvent être révélées dans ce manuscrit car une demande de brevet est en cours. Cependant, les résultats de la mesure de l'activité normalisée en fonction de la concentration en inhibiteur pour les composés les plus représentatifs sont présentés **Figure 25**.

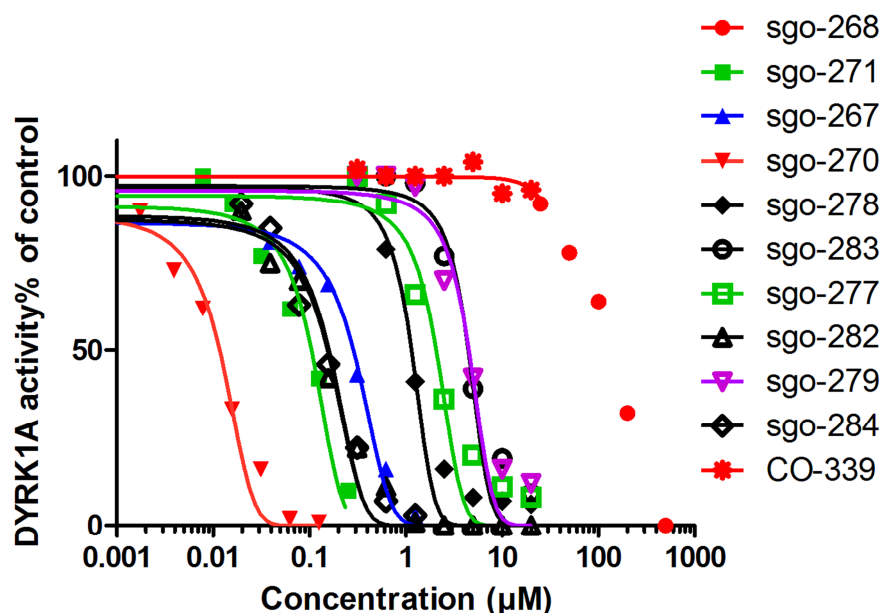


Figure 25
Inhibition de l'activité DYRK1A par les molécules synthétisées par l'équipe de R Dodd

Activité normalisée de DYRK1A en fonction de la concentration en inhibiteur (abscisse) pour des concentrations de 50 μ M en ATP et 30 μ M de peptide.

Dans le **tableau suivant** sont présentées les valeurs d'IC₅₀ pour une partie des molécules testées

<i>codes</i>	IC₅₀ (nM)
harmine	230
sgo163	326
sgo162	965
sgo164	416
sgo261	2698
sgo257	7490
sgo283	3592
sgo278	963
sgo282	154
sgo277	1167
sgo284	160
sgo279	3076
sgo259	23.1
sgo258	1744
sgo270	11.7
sgo267	287
sgo229	12.4
sgo271	105
sgo268	14630

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux molécules dont l'IC₅₀ était plus basse que celle de l'harmine, trois de ces composés (sgo 229, sgo 259, sgo 270) possèdent des IC₅₀ de l'ordre de la dizaine du nanomolaire. Nous avons déterminé le mécanisme d'action vis-à-vis des deux substrats pour chacune de ces molécules, pour cela nous avons utilisé la même procédure que pour l'harmine c'est à dire en faisant varier la concentration des deux substrats ATP de 50 à 400 µM et Peptide de 5 à 30 µM avec plusieurs concentrations d'inhibiteurs (valeurs variables suivant les IC₅₀).

Les résultats obtenus sont d'un point de vue qualitatif exactement les mêmes qu'avec l'harmine : inhibition réversible de type compétitif vis-à-vis de l'ATP et non compétitif vis du peptide. En revanche d'un point de vue quantitatif nous avons obtenu des valeurs de K_I qui sont plus basses, autrement dit les inhibiteurs testés ont une meilleure affinité pour DYRK1A que l'harmine (entre un facteur 13 à 100). Un récapitulatif des valeurs des K_I est présenté dans le **tableau suivant** :

Code	K_I (nM)
Harminine	202 ± 31
sgo229	10 ± 2
sgo259	$2,3 \pm 1$
sgo270	14 ± 2

3.4 Tests *in vivo* de l'activité endogène DYRK1A

3.4.1 Mise au point du dosage

Le test d'activité a également été testé *in vivo* sur des extraits de cerveau de souris. A partir d'un broyat de cerveau, nous avons pu mettre en évidence une l'activité endogène DYRK1A grâce au test HPLC. Comme le montre la **Figure 26**, l'aire du pic produit augmente avec le temps de façon linéaire, la pente de cette droite représente la vitesse de formation de produit. Les vitesses mesurées sont dépendantes de la quantité de protéines totales. Pour une certaine quantité de protéine, l'augmentation de l'aire du pic en fonction du temps n'est linéaire que durant environ 5 minutes.

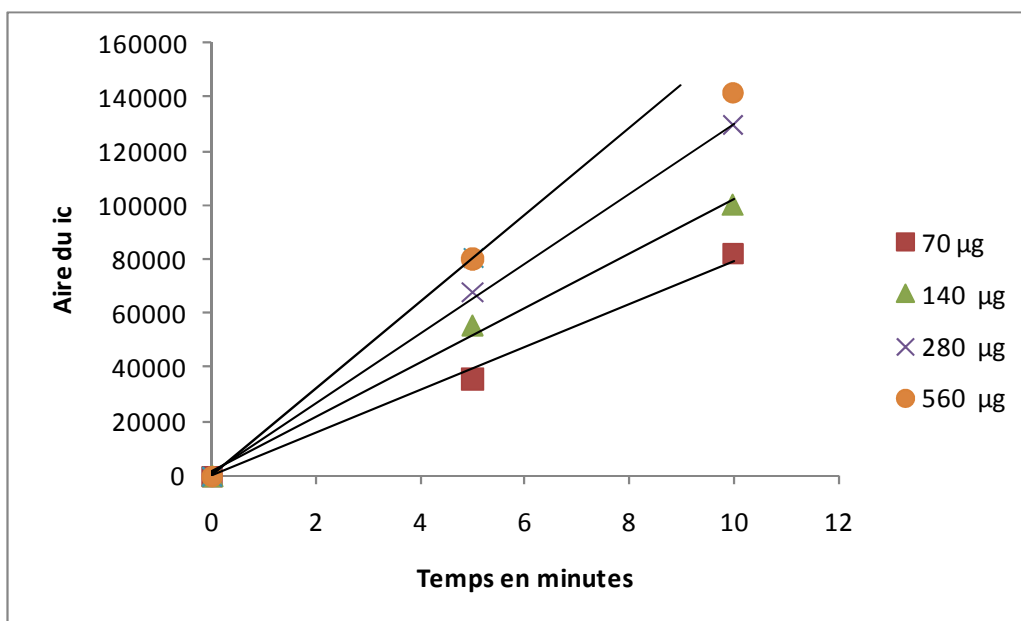


Figure 26
Mesure de l'activité endogène de DYRK1A

3.4.2 Tests des inhibiteurs dans un contexte cellulaire

Les composés les plus prometteurs ont été testés sur les extraits de cerveaux de souris. Plusieurs concentrations en inhibiteur ont été utilisées et les résultats présentés dans la **Figure 27** ; les gammes de concentration ne sont pas les mêmes suivant l'inhibiteur. L'expérience a également été faite avec l'harmine comme inhibiteur de référence. D'une façon générale les IC_{50} retrouvées dans un contexte cellulaire sont plus élevées que lorsque le test d'inhibition est effectué sur l'enzyme recombinante. Mais ce décalage n'est pas identique pour tous les inhibiteurs, ainsi la molécule sgo229 qui est très efficace sur l'enzyme recombinante est un inhibiteur relativement médiocre de la DYRK1A endogène. En revanche, les composés sgo259 et 270 semblent tout aussi intéressants quant à leur potentiel inhibiteur de DYRK1A.

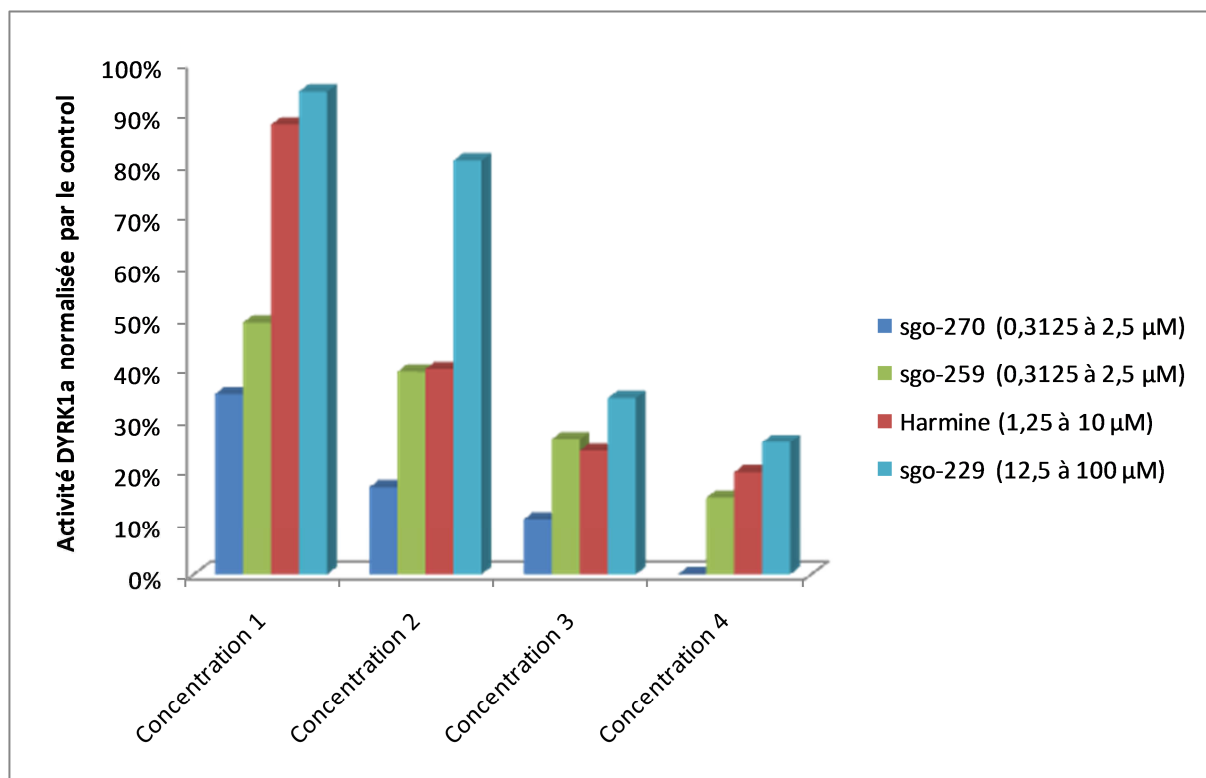


Figure 27
Inhibition de l'activité DYRK1A endogène par les molécules synthétisées par l'équipe de R Dodd

4 Discussion générale, conclusion générale et perspectives

La méthode de dosage de DYRK1A par HPLC s'est révélée être sensible. En comparaison avec le test kinase utilisant la radioactivité, notre méthode est tout aussi précise. Ainsi, l'étude publiée par Adayev et al (Adayev et al, 2011) détermine les paramètres cinétiques de DYRK1A par un test kinase classique : les valeurs de K_M et k_{cat} rapportées sont très proches des valeurs que nous avons obtenues. La quantité d'enzyme utilisée par Adayev et coll. était de 50 ng ; nous utilisons en routine seulement 25 ng de DYRK1A. De plus, les méthodes d'analyse par radioactivité sont onéreuses et demandent de prendre des précautions importantes de manipulation. Les $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ et $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ ne sont utilisables qu'en petite quantité et possèdent une demi-vie courte nécessitant un apport fréquent d'ATP radioactif durant les manipulations. Les concentrations de ^{32}P et ^{33}P nécessaires pour réaliser ces tests d'activité kinases sont importantes et cela limite considérablement ce type de manipulations.

La méthode de l'ELISA direct en sandwich est une méthode plus facilement réalisable ; elle permet un rendement plus élevé et est peu onéreuse. Cette méthode utilise des anticorps couplés à la biotine. La révélation se fait grâce aux liaisons spécifiques qui se forment entre la biotine et la streptavidine. L'utilisation d'anticorps phosphospécifiques dirigés contre des phosphopeptides améliore la sensibilité de la méthode mais une des limites est de trouver la dilution convenable pour le mélange réactionnel. La fragilité des enzymes utilisées et la restriction du test à un seul type de substrat à la fois sont également des limites à prendre en considération.

Les limites de l'IMAP FP ou TR-FRET sont principalement les mises en œuvre de ces tests dans des contextes cellulaires et/ou *in vivo*. Les manipulations sont longues et les résultats souvent difficilement interprétables. La caractérisation et la réduction des bruits de fond lors de la lecture de la plaque par la FlexStation 3 sont nécessaires pour étudier de façon précise l'activité de DYRK1A. Cependant, ces protocoles d'optimisation s'avèrent difficiles à mettre en œuvre.

Le test que nous avons développé au sein de la plateforme d'analyse de biomolécules "Bioprofiler" de l'unité BFA est basé sur la séparation du substrat/produit par HPLC.

L'utilisation d'un groupement fluorescent sur le peptide permet d'une part d'augmenter la sensibilité de la détection, et d'autre part d'en augmenter la sélectivité. Contrairement aux propriétés d'absorbance (210 nm), peu de biomolécules fluorescent aux longueurs d'onde du FAM. En contexte cellulaire, les chromatogrammes en détection par fluorescence sont relativement pauvres en pics contrairement aux spectres obtenus par absorbance.

L'échelle de temps couverte par un chromatogramme est relativement courte (5 minutes). Cependant une étude de cinétique Michaelienne nécessite l'obtention d'une centaine de chromatogrammes, ce qui représente un temps de mesure cumulé d'au moins 8 heures, auquel il faut ajouter le temps d'analyses des données. Ce test peut apparaître long, cependant l'utilisation d'injecteurs automatiques permet d'effectuer les injections durant la nuit. Les analyses de données peuvent également être automatisées. La fiabilité du matériel et des colonnes autorise une répétabilité très forte lors des processus d'élution chromatographique. Nous n'avons observé, sur une séquence de plus de 100 injections, qu'une variabilité du temps de rétention de quelques secondes. Il est ainsi possible d'utiliser des programmes d'intégration automatique basés sur un même temps de rétention. Au final, la quantification par intégration d'un pic d'intérêt analysé à partir d'une centaine de chromatogrammes s'effectue en quelques minutes.

Ce test s'est révélé tout aussi efficace *ex vivo* ; l'activité DYRK1A endogène a ainsi pu être mesurée dans des extraits de cerveau de souris. Moins de 20 µg de protéine totale sont alors suffisant pour détecter une activité DYRK1A endogène. Disposant d'un test opérationnel de DYRK1A *in vitro* et *ex vivo* nous l'avons utilisé pour tester des dérivés hétérocycliques azotés de faibles poids moléculaires comme inhibiteurs potentiels.

Les découvertes de Himpel (Himpel et al, 2000, 2001) ont permis de jeter les premières bases de la structure de DYRK1A. Kim ND et coll. ont ensuite mis au point un modèle 3D de la structure du domaine kinase de DYRK1A en utilisant l'homologie des boucles d'activation de DYRK1A et GSK3β (34%). Ils ont alors entrepris d'étudier *in silico* et par criblage *in vitro* des inhibiteurs de l'autophosphorylation de la Tyr321 et du site de liaison de l'ATP (Kim et al, 2006). Deux composés ont émergé malgré des observations non concluantes. Bain et coll. reprirent ce type d'analyse et testèrent 65 composés rapportés comme étant inhibiteurs spécifiques de 80 protéines kinases (Bain et al, 2007). L'harmine fut

ainsi identifiée comme un potentiel inhibiteur spécifique de DYRK1A *in vitro*, l'IC₅₀ = 0.35 µM.

L'harmine est un composé β-carboline (212 Da), alcaloïde naturel connu pour être un inhibiteur de la monoamine oxydase A ; c'est un antagoniste de la sérotonine qui a des propriétés hallucinogènes avec des effets à court terme et réversibles (Bain et al, 2007 ; pour revue Becker et al, 2011). L'harmine fut prescrite en traitement contre la maladie du Parkinson au début du XXème siècle. La structure cristallographique du complexe DYRK1A/harmine suggère que le volume de la poche de liaison de l'ATP a le volume adéquat pour accueillir un composé β-carboline. L'harmine interagit avec les résidus de cette poche, c'est un inhibiteur compétitif de l'ATP. Deux ponts hydrogènes sont établis entre l'harmine et la Met240 et la Lys188 de DYRK1A (**Figure 28a**) (Adayev et al, 2011 ; pour revue Becker et al, 2011). Récemment, une étude sur les Ts65Dn a permis de suggérer que l'harmine préviendrait une différenciation neuronale précoce, et qu'une normalisation pharmacologique de l'activité de DYRK1A pourrait avoir un rôle dans un traitement thérapeutique dans le Syndrome de Down (Mazur-Kolecka et al, 2012). L'harmine pourrait également inhiber l'hyperphosphorylation de la protéine Tau induite par DYRK1A, tel qu'observé dans la trisomie 21 (Frost et al, 2011).

L'EGCG (**Figure 28c**) ou épigallocatechine gallate est la principale catéchine, c'est un polyphénol, un des composés majeurs du thé vert. L'EGCG est un antioxydant neutralisant les radicaux libres et un inhibiteur spécifique de DYRK1A à forte concentration, il est connu pour réguler un certains nombres d'enzymes et de processus cellulaires (Bain et al, 2003 ; Adhami et al, 2003 ; Adayev et al, 2006a ; pour revue Mandel et al, 2004, 2008). Des approches génétiques et biochimiques, de mutagenèse dirigée, d'analyses cinétiques, de dosages de l'activité enzymatiques de DYRK1A et de transfections transitoires sur des protéines recombinantes résistantes à l'action inhibitrice de l'EGCG suggèrent qu'il est un inhibiteur non compétitif de l'ATP; son IC₅₀ est de 0.33 µM pour 100 µM d'ATP et il se lie à un site spécifique au niveau des sous-domaines X-XI pour inhiber l'activité catalytique de DYRK1A (Bain et al, 2003 ; Adayev et al, 2006a). L'EGCG a la propriété de traverser la barrière hémato-encéphalique (Lin et al, 2007) et la barrière placentaire (Chu et al, 2007).

Un nouvel inhibiteur synthétique de DYRK1A, appelé INDY, a été caractérisé par cristallographie aux rayons X (**Figure 28b**) (Ogawa et al, 2010). INDY est un dérivé

benzothiazole. Inhibiteur potentiel de DYRK1A, il est hautement sélectif. La proINDY, précurseur de l'INDY, s'avère efficace pour compenser des malformations de la tête induites par une surexpression de DYRK1A au sein d'embryons de Xénope (Ogawa et al, 2010). L'inhibition de DYRK1A par INDY est comparable à celle de l'harmine, les mécanismes structuraux de l'inhibition sont similaires. La cristallographie aux rayons X a permis de mettre en évidence qu'INDY est un inhibiteur compétitif de l'ATP qui se lie au site de liaison de l'ATP en interagissant avec DYRK1A par des ponts hydrogènes avec les résidus Leu241 et Lys188 ($IC_{50} = 0.24 \mu M$, $K_i = 0.18 \mu M$). Il aurait la propriété d'inhiber la phosphorylation aberrante de la protéine Tau et de rétablir la signalisation de NFATc réprimée ; ces processus étant induits par la surexpression de DYRK1A. (Ogawa et al, 2010 ; pour revue Becker et al, 2011). Une augmentation de 1.5 fois l'expression de DYRK1A est considérée comme pathogénique : il semblerait possible d'utiliser une dose d'INDY relativement faible pour réduire l'activité catalytique de DYRK1A. Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier les effets d'INDY chez les souris transgéniques, afin d'évaluer les possibilités d'utiliser le complexe INDY/DYRK1A comme agent thérapeutique dans le Syndrome de Down (Ogawa et al, 2010). Le lien entre DYRK1A, l'hyperphosphorylation de la protéine Tau et l'augmentation de la phosphorylation de la protéine amyloïde est par ailleurs de plus en plus établi. INDY ayant la propriété d'inhiber la phosphorylation de la Tyr212 de Tau, *in vitro*, il serait intéressant de l'utiliser pour comprendre le rôle de DYRK1A dans la formation des DNF et pour examiner le cas échéant la possibilité que DYRK1A constituerait une nouvelle cible thérapeutique en contexte de pathologies dégénératives: maladie d'Alzheimer et autres neuropathies.

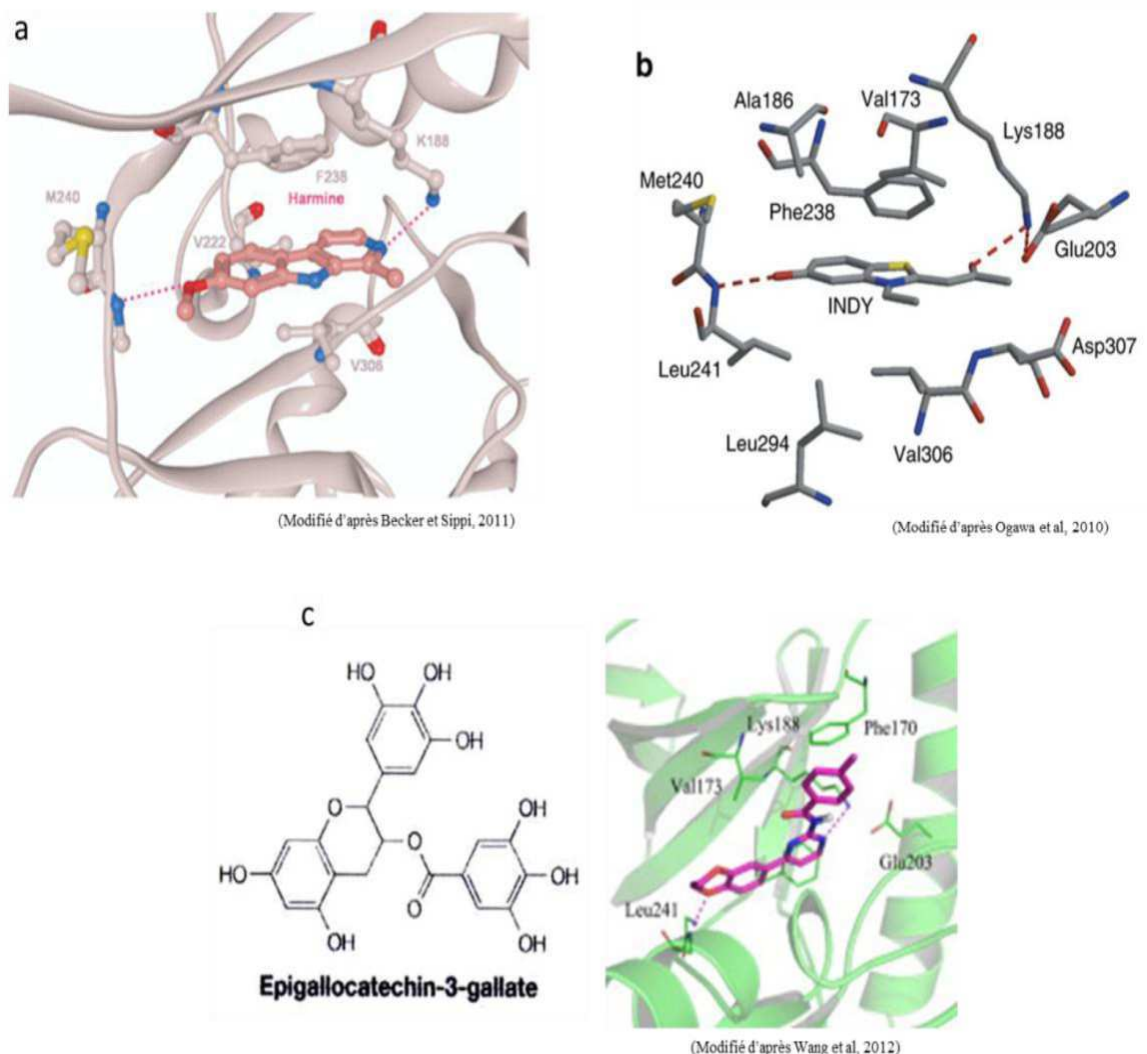


Figure 28a, b et c

Inhibiteurs potentiels de DYRK1A (d'après Ogawa et al, 2010 ; Becker et Sippl, 2011 ; Wang et al, 2012).

a) L'harmine ($IC_{50} = 0,35 \mu M$) est un inhibiteur naturel de l'activité de DYRK1A mature et de son autophosphorylation sur la Tyr321 durant sa synthèse. Il prévient la formation de l'enzyme active. Il se fixe au niveau de la poche de liaison de l'ATP et établit des liaisons hydrogènes avec la Lys188 et la Leu241.

b) L'INDY (Inhibitor of Dyrk) ($IC_{50} = 0,24 \mu M$) est un inhibiteur synthétique, hautement sélectif et compétitif contre l'ATP. Il se lie au niveau du site de liaison de l'ATP en établissant des liaisons hydrogènes avec la Leu241 et la Lys188. L'inhibition de DYRK1A par INDY est comparable avec celle de l'harmine dont il peut être le substitut.

c) L'ECGC (Epigallocatechin-3-gallate) ($IC_{50} = 0,33 \mu M$) est un inhibiteur naturel (polyphénol) non compétitif contre l'ATP. C'est un composé majeur du thé vert, il inactive DYRK1A par liaison à un site au niveau des sous-domaines X et XI en établissant des liaisons avec les résidus Lys465 et Arg467 (ce dernier est hautement conservé) et inhibe ainsi l'activité de DYRK1A

Les synthèses réalisées par l'équipe de R Dodd ont été guidées par la modélisation moléculaire et l'utilisation de techniques de « docking », à partir de la structure tridimensionnelle de la Dyrk1A cristalline. Le modèle de docking réalisé avec l'harmine est représenté dans la **Figure 28a**.

En tenant compte principalement des possibilités de création de liaisons hydrogène stabilisatrices, ont été conçus des inhibiteurs extrêmement actifs. L'existence d'une poche hydrophobe nous permet d'envisager la synthèse de composés encore plus performants, en jouant notamment sur la nature des groupements R et R' ou en introduisant d'autres hétéroatomes. Nous avons pu identifier des composés qui présentent des activités d'inhibition sur la protéine Dyrk1A très intéressantes, avec des IC₅₀ de l'ordre de 10 nM et sont de ce fait parmi les plus puissants inhibiteurs de cette enzyme connus à ce jour.

L'inhibition de kinases est généralement associée à des effets cytotoxiques. Tous les composés ont été évalués sur leur potentiel cytotoxique (résultats effectués par les collègues chimistes). Les résultats ont montré que les dérivés sgo 229, 259 et 270 présentant les meilleures IC₅₀ sur DYRK1A ne possédaient quasiment aucune cytotoxicité sur les cellules KB à 10⁻⁵ et 10⁻⁶ M.

Ces dérivés étant quasiment dépourvus de cytotoxicité, ce sont des candidats potentiellement intéressants pour un traitement de déficiences cognitives et mnésiques associées à la trisomie 21 et à la maladie d'Alzheimer.

Dans la perspective logique de ce travail, il reste à tester les meilleurs candidats sur des modèles transgéniques du SD.

Lors d'études utilisant des modèles murins pour la trisomie 21 (**Figure 4**), plusieurs molécules ont d'ores et déjà été testées afin d'étudier leur influence sur la mémoire et l'apprentissage (Gardiner et al, 2006, pour revue Gardiner et al, 2010a/b). Le but ultime étant d'envisager un jour des traitements pouvant améliorer la mémorisation et l'apprentissage des personnes trisomiques et peut être même réduire leur retard mental. Pour l'heure, ces molécules sont testées sur des cellules et des souris transgéniques servant de modèles d'études pour la trisomie 21. Le test d'activité kinase mis au point au cours de ce projet pourrait s'avérer utile pour approfondir ces types d'études.

Une étude clinique menée chez l'Homme (Lott et al, 2002) a permis de mettre en évidence qu'une stratégie thérapeutique ciblée pouvait être envisageable. Dans la maladie d'Alzheimer et le Syndrome de Down, un déficit cholinergique est détecté et serait impliqué dans le déclin cognitif, linguistique et comportemental (Hassin-Baer et al, 1992). Se basant sur l'amélioration observée de la neurotransmission cholinergique dans la maladie d'Alzheimer par traitement avec un inhibiteur de l'acétylcholinestérase, le donepezil (Sunderland et al, 1998 ; Evans et al, 2000), des tests pharmacologiques chez des personnes trisomiques ont été envisagés. Le donepezil semble permettre de lutter contre l'apparition clinique de la démence durant le début et la période qui suit le début du déclin cognitif. Son utilisation semble être associée à une amélioration significative du fonctionnement cognitif à court terme (Lott et al, 2002).

Une autre perspective importante de ce travail concerne les applications potentielles du test HPLC. Celui-ci peut s'adapter à la mesure d'autres activités kinases, phosphatases et phosphodiesterases ; il faut pour cela utiliser des peptides spécifiques à l'activité de l'enzyme à détecter. D'une façon plus globale toute modification de protéine (peptide) qui peut être identifiée par HPLC peut constituer un moyen de mesurer l'activité enzymatique qui catalyse cette modification. Sur la plateforme Bioprofiler de l'unité BFA, des tests d'activité pour des méthyltransférases, des acetyltransférases, etc. sont en cours de développement.

5 Bibliographie

A

Adayev T, Wegiel J, Hwang YW (2011) Harmine is an ATP-competitive inhibitor for dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (Dyrk1A). *Arch Biochem Biophys* 507: 212-8.

Adayev T, Chen-Hwang MC, Murakami N, Lee E, Bolton DC, Hwang YW (2007) Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A does not require tyrosine phosphorylation for activity in vitro. *Biochemistry* 46: 7614-24.

Adayev T, Chen-Hwang MC, Murakami N, Wegiel J, Hwang YW (2006a) Kinetic Properties of a MNB/DYRK1A Mutant Suitable for the Elucidation of Biochemical Pathways. *Biochemistry* 45:12011-12019.

Adhami VM, Ahmad N, Mukhtar H (2003) Molecular targets for green tea in prostate cancer prevention. *J Nutr* 133: 2417S-2424S. Review

Ahn KJ, Jeong HK, Choi HS, Ryoo SR, Kim YJ, Goo JS, Choi SY, Han JS, Ha I, Song WJ (2006) DYRK1A BAC Transgenic Mice Show Altered Synaptic Plasticity with Learning and Memory Defects. *Neurobiol Dis* 22: 463-472.

Ait Yahya-Graison E, Aubert J, Dauphinot L, Rivals I, Prieur M, Golfier G, Rossier J, Personnaz L, Creau N, Blehaut H, Robin S, Delabar JM, Potier MC (2007) Classification of Human Chromosome 21 Gene- Expression Variations in Down Syndrome: Impact on Disease Phenotypes. *Am J Hum Genet* 81: 475 – 491.

Altafaj X, Ortiz-Abalia J, Fernández M, Potier MC, Laffaire J, Andreu N, Dierssen M, González-García C, Ceña V, Martí E, Fillat C (2008) Increased NR2A expression and prolonged decay of NMDA-induced calcium transient in cerebellum of TgDyrk1A mice, a mouse model of Down syndrome. *Neurobiol Dis* 32: 377-84.

Altafaj X, Dierssen M, Baamonde C, Martí E, Visa J, Guimera J, Oset M, Gonzalez JR, Florez J, Fillat C, Estivill X (2001) Neurodevelopmental Delay, Motor Abnormalities and Cognitive Deficits in Transgenic Mice Overexpressing Dyrk1A (Minibrain), a Murine Model of Down's Syndrome. *Hum Mol Genet* 10: 1915-1923.

Alvarez M, Altafaj X, Aranda S, de la LS (2007). DYRK1A Autophosphorylation on Serine Residue 520 Modulates Its Kinase Activity via 14-3-3 Binding. *Mol Biol Cell* 18: 1167-1178.

Alvarez M, Estivill X, de la LS (2003) DYRK1A Accumulates in Splicing Speckles through a Novel Targeting Signal and Induces Speckle Disassembly. *J Cell Sci* 116: 3099-3107.

Anneren G, Gustavson KH, Sara VR, Tuvemo T (1990) Growth Retardation in Down Syndrome in Relation to Insulin-Like Growth Factors and Growth Hormone. *Am J Med Genet Suppl* 7: 59-62.

Antonarakis SE, Epstein CJ (2006). The Challenge of Down Syndrome. *Trends Mol Med* 12: 473-479. Review

Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Reymond A, Deutsch S (2004) Chromosome 21 and Down Syndrome: From Genomics to Pathophysiology. *Nat Rev Genet* 5: 725-738. Review

Arron JR, Winslow MM, Polleri A, Chang CP, Wu H, Gao X, Neilson JR, Chen L, Heit JJ, Kim SK, Yamasaki N, Miyakawa T, Francke U, Graef IA, Crabtree GR (2006) NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature* 441: 595-600.

B

- Bain J, McLauchlan H, Elliott M, Cohen P (2003).** The Specificities of Protein Kinase Inhibitors: an Update. *Biochem J* 371: 199-204.
- Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P (2007).** The Selectivity of Protein Kinase Inhibitors: a Further Update. *Biochem J* 408: 297-315.
- Ballif BA, Villen J, Beausoleil SA, Schwartz D, Gygi SP (2004).** Phosphoproteomic Analysis of the Developing Mouse Brain. *Mol Cell Proteomics* 3: 1093-1101.
- Baptista MJ, Fairbrother UL, Howard CM, Farrer MJ, Davies GE, Triokka D, Maratou K, Redington A, Greve G, Njølstad PR, Kessling AM (2000)** Heterotrismy, a significant contributing factor to ventricular septal defect associated with Down syndrome? *Hum Genet* 107: 476-82.
- Barlow GM, Chen XN, Shi ZY, Lyons GE, Kurnit DM, Celle L, Spinner NB, Zackai E, Pettenati MJ, Van Riper AJ, Vekemans MJ, Mjaatvedt CH, Korenberg JR. (2001)** Down syndrome congenital heart disease: a narrowed region and a candidate gene. *Genet Med* 3: 91-101.
- Baxter LL, Moran TH, Richtsmeier JT, Troncoso J, Reeves RH (2000)** Discovery and genetic localization of Down syndrome cerebellar phenotypes using the Ts65Dn mouse. *Hum Mol Genet* 9: 195-202.
- Bayer KU, Schulman H (2001)** Regulation of Signal Transduction by Protein Targeting: the Case for CaMKII. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 917-923.
- Beasley JR, Dunn DA, Walker TL, Parlato SM, Lehrach JM, Auld DS (2003)** Evaluation of compound interference in immobilized metal ion affinity-based fluorescence polarization detection with a four million member compound collection. *Assay Drug Dev Technol* 1: 455-9.
- Becker W, Sippl W (2011)** Activation, regulation, and inhibition of DYRK1A. *FEBS J* 278: 246-56. Review
- Becker W, Weber Y, Wetzel K, Eirimbter K, Tejedor FJ, Joost HG (1998).** Sequence Characteristics, Subcellular Localization, and Substrate Specificity of DYRK-Related Kinases, a Novel Family of Dual Specificity Protein Kinases. *J Biol Chem* 273: 25893-25902.
- Belichenko NP, Belichenko PV, Kleschevnikov AM, Salehi A, Reeves RH, Mobley WC (2009)** The "Down Syndrome Critical Region" Is Sufficient in the Mouse Model to Confer Behavioral, Neurophysiological, and Synaptic Phenotypes Characteristic of Down Syndrome. *J Neurosci* 29: 5938-5948.
- Bianca S, Bianca M, Ettore G (2002)** Oesophageal atresia and Down syndrome. *Downs Syndr Res Pract* 8: 29-30. 1: 3-17. Review
- Blouin JL, Duriaux SG, Guipponi M, Rossier C, Pappasavas MP, Antonarakis SE (1998)** Isolation of the Human BACH1 Transcription Regulator Gene, Which Maps to Chromosome 21q22.1. *Hum Genet* 102: 282-288.
- Branchi I, Bichler Z, Minghetti L, Delabar JM, Malchiodi-Albedi F, Gonzalez MC, Chettouh Z, Nicolini A, Chabert C, Smith DJ, Rubin EM, Migliore-Samour D, Alleva E (2004)** Transgenic Mouse in Vivo Library of Human Down Syndrome Critical Region 1: Association Between DYRK1A Overexpression, Brain Development Abnormalities, and Cell Cycle Protein Alteration. *J Neuropathol Exp Neurol* 63: 429-440.

C

- Canfield MA, Honein MA, Yuskiv N, Xing J, Mai CT, Collins JS, Devine O, Petrini J, Ramadhani TA, Hobbs CA, Kirby RS (2006)** National Estimates and Race/Ethnic-Specific Variation of Selected Birth Defects in the United States, 1999-2001. *Birth Defects Res.A Clin.Mol.Teratol* 76: 747-756

Carlson GA, Borchelt DR, Dake A, Turner S, Danielson V, Coffin JD, Eckman C, Meiners J, Nilsen SP, Younkin SG, Hsiao KK (1997) Genetic modification of the phenotypes produced by amyloid precursor protein overexpression in transgenic mice. *Hum Mol Genet* 6: 1951-9

Cheek S, Ginalski K, Zhang H, Grishin NV (2005) A Comprehensive Update of the Sequence and Structure Classification of Kinases. *BMC Struct Biol* 5: 6.

Chen H, Antonarakis SE (1997) Localisation of a Human Homologue of the Drosophila Mnb and Rat Dyrk Genes to Chromosome 21q22.2. *Hum. Genet* 99: 262-265.

Cheon MS, Bajo M, Kim SH, Claudio JO, Stewart AK., Patterson D, Kruger WD, Kondoh H, Lubec G (2003) Protein Levels of Genes Encoded on Chromosome 21 in Fetal Down Syndrome Brain: Challenging the Gene Dosage Effect Hypothesis (Part II). *Amino.Acids* 24: 119-125

Chu KO, Wang CC, Chu CY, Choy KW, Pang CP, Rogers MS (2007) Uptake and distribution of catechins in fetal organs following in utero exposure in rats. *Hum Reprod* 22: 280-7.

Collingridge GL, Isaac JT, Wang YT (2004) Receptor Trafficking and Synaptic Plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5: 952-962.

Coussons-Read ME, Crnic LS (1996) Behavioral Assessment of the Ts65Dn Mouse, a Model for Down Syndrome: Altered Behavior in the Elevated Plus Maze and Open Field. *Behav Genet* 26: 7-13.

Cronk C, Crocker AC, Pueschel SM, Shea AM, Zackai E, Pickens G, Reed RB (1988). Growth Charts for Children with Down Syndrome: 1 Month to 18 Years of Age. *Pediatrics* 81: 102-110.

D

Dahmane N, Ghezala GA, Gosset P, Chamoun Z, Dufresne-Zacharia MC., Lopes C, Rabatel N, Gassanova-Maugenre S, Chettouh Z et al (1998) Transcriptional Map of the 2.5-Mb CBR-ERG Region of Chromosome 21 Involved in Down Syndrome. *Genomics* 48: 12-23.

Davisson MT, Schmidt C, Reeves RH, Irving NG, Akeson EC, Harris BS, Bronson RT (1993) Segmental trisomy as a mouse model for Down syndrome. *Prog Clin Biol Res* 384: 117-33.

Delabar JM, Theophile D, Rahmani Z, Chettouh Z, Blouin JL, Prieur M, Noel B, Sinet PM (1993) Molecular Mapping of Twenty-Four Features of Down Syndrome on Chromosome 21. *Eur J Hum Genet* 1: 114-124.

Delabar JM, Aflalo-Rattenbac R, Creau N (2006) Developmental Defects in Trisomy 21 and Mouse Models. *ScientificWorldJournal* 6: 1945-1964.

Dhanasekaran N, Premkumar RE (1998). Signaling by Dual Specificity Kinases. *Oncogene* 17: 1447-1455.

Dierssen M, Vallina IF, Baamonde C, García-Calatayud S (1997) Alterations of central noradrenergic transmission in Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome. *Brain Res* 749: 238-44.

Dierssen M, Herault Y, Estivill X (2009). Aneuploidy: From a Physiological Mechanism of Variance to Down Syndrome. *Physiol Rev* 89: 887-920 Review

Dowjat WK, Adayev T, Kuchna I, Nowicki K, Palmminiello S, Hwang YW, Wegiel J (2007). Trisomy-Driven Overexpression of DYRK1A Kinase in the Brain of Subjects With Down Syndrome. *Neurosci Lett* 413: 77-81.

Down JL (1995) Observations on an Ethnic Classification of Idiots. **1866.** *Ment Retard* 33: 54-56.

E

Epstein CJ (2001-2002). William Allan Award Address. From Down Syndrome to the "Human" in "Human Genetics". *Am J Hum Genet* 70: 300-313.

Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Vallina IF, Baamonde C, Lumbreras MA, Dierssen M, Tobena A, Florez J (1998). A Behavioral Assessment of Ts65Dn Mice: a Putative Down Syndrome Model. *Neurosci Lett* 199: 143-146.

Evans M, Ellis A, Watson D, Chowdhury T (2000) Sustained cognitive improvement following treatment of Alzheimer's disease with donepezil. *Int J Geriatr Psychiatry* 15: 50-3

F

Fidler DJ, Nadel L (2007). Education and Children With Down Syndrome: Neuroscience, Development, and Intervention. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 13: 262-271.

Fotaki V, Dierssen M, Alcantara S, Martinez S, Marti E, Casas C, Visa J, Soriano E, Estivill X, Arbones ML (2002). Dyrk1A Haploinsufficiency Affects Viability and Causes Developmental Delay and Abnormal Brain Morphology in Mice. *Mol Cell Biol* 22: 6636-6647.

Frost D, Meechoovet B, Wang T, Gately S, Giorgetti M, Shcherbakova I, Dunckley T (2011) β -carboline compounds, including harmine, inhibit DYRK1A and tau phosphorylation at multiple Alzheimer's disease-related sites. *PLoS One* 6: e19264.

Fujita H, Torii C, Kosaki R, Yamaguchi S, Kudoh J, Hayashi K, Takahashi T, Kosaki K (2010). Microdeletion of the Down Syndrome Critical Region at 21q22. *Am J Med Genet A* 152A: 950-953.

G

Galdzicki Z, Siarey R, Pearce R, Stoll J, Rapoport SI (2001). On the Cause of Mental Retardation in Down Syndrome: Extrapolation From Full and Segmental Trisomy 16 Mouse Models. *Brain Res Brain Res Rev* 35: 115-145.

Gardiner K (2006) Transcriptional dysregulation in Down syndrome: predictions for altered protein complex stoichiometries and post-translational modifications, and consequences for learning/behavior genes ELK, CREB, and the estrogen and glucocorticoid receptors. *Behav Genet* 36: 439-53. Review

Gardiner K, Herault Y, Lott IT, Antonarakis SE, Reeves RH, Dierssen M (2010b) Down syndrome: from understanding the neurobiology to therapy. *J Neurosci* 30: 14943-5. Review

Gardiner KJ (2010a). Molecular Basis of Pharmacotherapies for Cognition in Down Syndrome. *Trends Pharmacol Sci* 31: 66-73

Glasson EJ, Sullivan SG, Hussain R, Petterson BA, Montgomery PD, Bittles AH (2002) The changing survival profile of people with Down's syndrome: implications for genetic counselling. *Clin Genet* 62: 390-3.

Golden JA, Hyman BT (1994) Development of the Superior Temporal Neocortex Is Anomalous in Trisomy 21. *J Neuropathol Exp Neurol* 53: 513-520.

Guedj F, Sébrié C, Rivals I, Ledru A, Paly E, Bizot JC, Smith D, Rubin E, Gillet B, Arbones M, Delabar JM (2009) Green tea polyphenols rescue of brain defects induced by overexpression of DYRK1A. *PLoS One* 4: e4606.

Guedj F, Pereira PL, Najas S, Barallobre MJ, Chabert C, Souchet B, Sebie C, Verney C, Herault Y, Arbones M, Delabar JM (2012) DYRK1A: a master regulatory protein controlling brain growth. *Neurobiol Dis* 46: 190-203.

Guidi S, Bonasoni P, Ceccarelli C, Santini D, Gualtieri F, Ciani E, Bartesaghi R (2008). Neurogenesis Impairment and Increased Cell Death Reduce Total Neuron Number in the Hippocampal Region of Fetuses With Down Syndrome. *Brain Pathol* 18: 180-197.

Guimera J, Casas C, Estivill X, Pritchard M (1999). Human Minibrain Homologue (MNBH/DYRK1): Characterization, Alternative Splicing, Differential Tissue Expression, and Overexpression in Down Syndrome. *Genomics* 57: 407-418.

Guimera J, Casas C, Pucharcos C, Solans A, Domenech A, Planas AM, Ashley J, Lovett M, Estivill X, Pritchard MA (1996). A Human Homologue of Drosophila Minibrain (MNB) Is Expressed in the Neuronal Regions Affected in Down Syndrome and Maps to the Critical Region. *Hum Mol Genet* 5: 1305-1310.

Guimera J, Pritchard M, Nadal M, Estivill X (1997a). Minibrain (MNBH) Is a Single Copy Gene Mapping to Human Chromosome 21q22.2. *Cytogenet Cell Genet* 77: 182-184.

Guimera J, Pucharcos C, Domenech A, Casas C, Solans A, Gallardo T, Ashley J, Lovett M, Estivill X, Pritchard M (1997b). Cosmid Contig and Transcriptional Map of Three Regions of Human Chromosome 21q22: Identification of 37 Novel Transcripts by Direct Selection. *Genomics* 45: 59-67.

Gwack Y, Sharma S, Nardone J, Tanasa B, Iuga A, Srikanth S, Okamura H, Bolton D, Feske S, Hogan PG, Rao A (2006) A genome-wide Drosophila RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* 441: 646-50.

H

Hämmerle B, Carnicero A, Elizalde C, Ceron J, Martinez S, Tejedor FJ (2003). Expression Patterns and Subcellular Localization of the Down Syndrome Candidate Protein MNB/DYRK1A Suggest a Role in Late Neuronal Differentiation. *Eur J Neurosci* 17: 2277-2286.

Hämmerle B, Elizalde C, Tejedor FJ (2008). The Spatio-Temporal and Subcellular Expression of the Candidate Down Syndrome Gene Mnb/Dyrk1A in the Developing Mouse Brain Suggests Distinct Sequential Roles in Neuronal Development. *Eur J Neurosci* 27: 1061-1074.

Hanks SK, Quinn AM (1991) Protein Kinase Catalytic Domain Sequence Database: Identification of Conserved Features of Primary Structure and Classification of Family Members. *Methods Enzymol* 200: 38-62.

Hanks SK, Quinn AM, Hunter T (1988) The Protein Kinase Family: Conserved Features and Deduced Phylogeny of the Catalytic Domains. *Science* 241: 42-52.

Hanks SK, Hunter T (1995) Protein Kinases 6. The Eukaryotic Protein Kinase Superfamily: Kinase (Catalytic) Domain Structure and Classification. *FASEB J* 9: 576-596.

Hassin-Baer S, Wertman E, Raphael M, Stark V, Chapman J, Michaelson DM (1992) Antibodies from Down's syndrome patients bind to the same cholinergic neurofilament protein recognized by Alzheimer's disease antibodies. *Neurology* 42: 551-5

Hawli Y, Nasrallah M, El Hajj FG (2009) Endocrine and Musculoskeletal Abnormalities in Patients with Down Syndrome. *Nat Rev Endocrinol* 5: 327-334.

Haydar TF, Blue ME, Molliver ME, Krueger BK, Yarowsky PJ (1996). Consequences of Trisomy 16 for Mouse Brain Development: Corticogenesis in a Model of Down Syndrome. *J Neurosci* 16: 6175-6182.

Head E, Lott IT, Patterson D, Doran E, Haier RJ (2007). Possible Compensatory Events in Adult Down Syndrome Brain Prior to the Development of Alzheimer Disease Neuropathology: Targets for Nonpharmacological Intervention. *J Alzheimers Dis* 11: 61-76

Himpel S, Panzer P, Eirnbter K, Czajkowska H, Sayed M, Packman LC, Blundell T, Kentrup H, Grotzinger J, Joost HG, Becker W (2001). Identification of the Autophosphorylation Sites and Characterization of Their Effects in the Protein Kinase DYRK1A. *Biochem J* 359: 497-505.

Himpel S, Tegge W, Frank R, Leder S, Joost HG, Becker W (2000). Specificity Determinants of Substrate Recognition by the Protein Kinase DYRK1A. *J Biol Chem* 275: 2431-2438.

Holtzman DM, Santucci D, Kilbridge J, Chua-Couzens J, Fontana DJ, Daniels SE, Johnson RM, Chen K, Sun Y, Carlson E, Alleva E, Epstein CJ, Mobley WC (1996) Developmental abnormalities and age-related neurodegeneration in a mouse model of Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13333-13338

Huang EJ, Reichardt LF (2001). Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. *Annu Rev Neurosci* 24: 677-736.

Hubbard SR, Miller WT (2007). Receptor Tyrosine Kinases: Mechanisms of Activation and Signaling. *Curr Opin Cell Biol* 19: 117-123.

I

International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409(6822):860-921. Erratum in: *Nature* 2001 412: 565

International Human Genome Sequencing Consortium (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931-45

J

Jackson JF, North ER III, Thomas JG (1976). Clinical Diagnosis of Down's Syndrome. *Clin Genet* 9: 483-487.

Jacobs PA, Baikie AG, Court Brown WM, Strong JA (1959) The Somatic Chromosomes in Mongolism. *Lancet* 1: 710.

Jacobs PA, Hassold TJ (1995). The Origin of Numerical Chromosome Abnormalities. *Adv Genet* 33: 101-133.

K

Kannan N, Neuwald AF (2004) Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK, CDK, GSK, SRPK, DYRK, and CK2alpha. *Protein Sci* 13: 2059-77

Karlson B, Gustafsson J, Hedov G, Ivarsson SA, Anneren G (1998). Thyroid Dysfunction in Down's Syndrome: Relation to Age and Thyroid Autoimmunity. *Arch Dis Child* 79: 242-245.

Kentrup H, Becker W, Heukelbach J, Wilmes A, Schurmann A, Huppertz C, Kainulainen H, Joost HG (1996). Dyrk, a Dual Specificity Protein Kinase With Unique Structural Features Whose Activity Is Dependent on Tyrosine Residues Between Subdomains VII and VIII. *J Biol Chem* 271: 3488-3495.

Kim MY, Jeong BC, Lee JH, Kee HJ, Kook H, Kim NS, Kim YH, Kim JK, Ahn KY, Kim KK (2006) A repressor complex, AP4 transcription factor and geminin, negatively regulates expression of target genes in nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 13074-9.

Kim SY, Ahn BH, Kim J, Bae YS, Kwak JY, Min G, Kwon TK, Chang JS, Lee YH, Yoon SH, Min DS (2004). Phospholipase C, Protein Kinase C, Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II, and Redox State Are Involved in Epigallocatechin Gallate-Induced Phospholipase D Activation in Human Astrogloma Cells. *Eur J Biochem* 271: 3470-3480.

Kimura R, Kamino K, Yamamoto M, Nuripa A, Kida T, Kazui H, Hashimoto R, Tanaka T, Kudo T, Yamagata H, Tabara Y, Miki T et al (2007). The DYRK1A Gene, Encoded in Chromosome 21 Down Syndrome Critical Region, Bridges Between Beta-Amyloid Production and Tau Phosphorylation in Alzheimer Disease. *Hum Mol Genet* 16: 15-23.

Kola I, Hertzog PJ (1998) Down syndrome and mouse models. *Curr Opin Genet Dev* 8: 316-21. Review

Koo BK, Blaser S, Harwood-Nash D, Becker LE, Murphy EG (1992). Magnetic Resonance Imaging Evaluation of Delayed Myelination in Down Syndrome: a Case Report and Review of the Literature. *J Child Neurol* 7: 417-421.

Korenberg JR, Bradley C, Disteché CM. (1992). Down Syndrome: Molecular Mapping of the Congenital Heart Disease and Duodenal Stenosis. *Am J Hum Genet* 50: 294-302.

Korenberg JR, Chen XN, Schipper R, Sun Z, Gonsky R, Gerwehr S, Carpenter N, Daumer C, Dignan P, Disteché Cet al, (1994) Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4997-5001.

Korenberg JR, Aaltonen J, Brahe C, Cabin D, Creau N, Delabar JM, Doering J, Gardiner K, Hubert RS, Ives J, Kessling A, Kudoh J et al, (1996-1997) Report and abstracts of the Sixth International Workshop on Human Chromosome 21 Mapping. *Cytogenet Cell Genet* 79: 21-52

Kornev AP, Taylor SS (2010) Defining the Conserved Internal Architecture of a Protein Kinase. *Biochim Biophys Acta* 1804: 440-444.

L

Lapenta V, Sossi V, Gosset P, Vayssettes C, Vitali T, Rabatel N, Tassone F, Blouin JL, Scott HS, Antonarakis SE, Creau N, Brahe C (1998). Construction of a 2.5-Mb Integrated Physical and Gene Map of Distal 21q22.3. *Genomics* 49: 1-13.

Lee LG, Jackson JF (1972). Diagnosis of Down's Syndrome: Clinical Vs. Laboratory. *Clin Pediatr* 11: 353-356.

Lejeune J, Turpin R, Gautier M (1959). [Mongolism; a Chromosomal Disease (Trisomy)] *Bull. Acad Natl Med* 143: 256-265.

Levy J (1991). The Gastrointestinal Tract in Down Syndrome. *Prog Clin Biol Res* 373: 245-256.

Lilienthal E, Kolanowski K, Becker W (2010) Development of a sensitive non-radioactive protein kinase assay and its application for detecting DYRK activity in *Xenopus laevis* oocytes. *BMC Biochem* 11:20.

Lin LC, Wang MN, Tseng TY, Sung JS, Tsai TH (2007) Pharmacokinetics of (-)-epigallocatechin-3-gallate in conscious and freely moving rats and its brain regional distribution. *J Agric Food Chem* 55: 1517-24.

Lindberg RA, Quinn AM, Hunter T (1992). Dual-Specificity Protein Kinases: Will Any Hydroxyl Do? *Trends Biochem Sci* 17: 114-119

Lochhead PA, Sibbet G, Morrice N, Cleghon V (2005). Activation-Loop Autophosphorylation Is Mediated by a Novel Transitional INtermediate Form of DYRKs. *Cell* 121: 925-936.

Lott IT, Head E (2005) Alzheimer disease and Down syndrome: factors in pathogenesis. *Neurobiol Aging* 26: 383-9. Review

Lott IT, Osann K, Doran E, Nelson L (2002) Down syndrome and Alzheimer disease: response to donepezil. *Arch Neurol* 59: 1133-6.

Lubec G, Engidawork E (2002) The brain in Down syndrome (TRISOMY 21). *J Neurol* 249: 1347-56

Lyle R, Bena F, Gagos S, Gehrig C, Lopez G, Schinzel A, Lespinasse J, Bottani A, Dahoun S, et al (2009). Genotype-Phenotype Correlations in Down Syndrome Identified by Array CGH in 30 Cases of Partial Trisomy and Partial Monosomy Chromosome 21. *Eur J Hum Genet* 17: 454-466.

M

Maenz B, Hekerman P, Vela EM, Galceran J, Becker W (2008). Characterization of the Human DYRK1A Promoter and Its Regulation by the Transcription Factor E2F1. *BMC Mol Biol* 9: 30.

Mandel S, Weinreb O, Amit T, Youdim MB (2004). Cell Signaling Pathways in the Neuroprotective Actions of the Green Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-Gallate: Implications for Neurodegenerative Diseases. *J Neurochem* 88: 1555-1569.

Mandel SA, Amit T, Weinreb O, Reznichenko L, Youdim MB (2008) Simultaneous manipulation of multiple brain targets by green tea catechins: a potential neuroprotective strategy for Alzheimer and Parkinson diseases. *CNS Neurosci Ther Winter* 14: 352-65. Review

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002). The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* 298: 1912-1934.

Mazur-Kolecka B, Golabek A, Kida E, Rabe A, Hwang YW, Adayev T, Wegiel J, Flory M, Kaczmariski W, Marchi E, Frackowiak J (2012) Effect of DYRK1A activity inhibition on development of neuronal progenitors isolated from Ts65Dn mice. *J Neurosci Res* 90: 999-1010.

Megarbane A, Ravel A, Mircher C, Sturtz F, Grattau Y, Rethore MO, Delabar JM, Mobley WC (2009). The 50th Anniversary of the Discovery of Trisomy 21: the Past, Present, and Future of Research and Treatment of Down Syndrome. *Genet Med* 11: 611-616 Review

Mehta PD, Mehta SP, Fedor B, Patrick BA, Emmerling M, Dalton AJ (2003) Plasma amyloid beta protein 1-42 levels are increased in old Down Syndrome but not in young Down Syndrome. *Neurosci Lett* 342: 155-8

Moore CS (2006) Postnatal Lethality and Cardiac Anomalies in the Ts65Dn Down Syndrome Mouse Model. *Mamm Genome* 17: 1005-1012.

N

Nolen B, Taylor S, Ghosh G (2004) Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol Cell* 15: 661-75. Review

O

Ogawa Y, Nonaka Y, Goto T, Ohnishi E, Hiramatsu T, Kii I, Yoshida M, Ikura T, Onogi H, Shibuya H, Hosoya T, Ito N, Hagiwara M (2010) Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A. *Nat Commun* 1:86.

Ohira M, Seki N, Nagase T, Suzuki E, Nomura N, Ohara O, Hattori M, Sakaki Y, Eki T, Murakami Y, Saito T, Ichikawa H, Ohki M (1997). Gene Identification in 1.6-Mb Region of the Down Syndrome Region on Chromosome 21. *Genome Res.* 7: 47-58.

Okui M, Ide T, Morita K, Funakoshi E, Ito F, Ogita K, Yoneda Y, Kudoh J, Shimizu N (1999). High Level Expression of the Mnb/Dyrk1A Gene in Brain and Heart During Rat Early Development. *Genomics* 62: 165-171.

Olson LE, Roper RJ, Baxter LL, Carlson EJ, Epstein CJ, Reeves RH (2004a). Down Syndrome Mouse Models Ts65Dn, Ts1Cje, and Ms1Cje/Ts65Dn Exhibit Variable Severity of Cerebellar Phenotypes. *Dev Dyn* 230: 581-589.

Olson LE, Roper RJ, Sengstaken CL, Peterson EA, Aquino V, Galdzicki Z, Siarey R, Pletnikov M, Moran TH, Reeves RH (2007). Trisomy for the Down Syndrome 'Critical Region' Is Necessary but Not Sufficient for Brain Phenotypes of Trisomic Mice. *Hum Mol Genet* 16: 774-782.

Osoegawa K, Susukida R, Okano S, Kudoh J, Minoshima S, Shimizu N, de Jong PJ, Groet J, Ives J, Lehrach H, Nizetic D, Soeda E (1996). An Integrated Map With Cosmid/PAC Contigs of a 4-Mb Down Syndrome Critical Region. *Genomics* 32: 375-387.

P

Park J, Oh Y, Yoo L, Jung MS, Song WJ, Lee SH, Seo H, Chung KC (2010) Dyrk1A phosphorylates p53 and inhibits proliferation of embryonic neuronal cells. *J Biol Chem* 285: 31895-906.

Park J, Oh Y, Chung KC (2009a). Two Key Genes Closely Implicated With the Neuropathological Characteristics in Down Syndrome: DYRK1A and RCAN1. *BMB Rep* 42: 6-15.

Park J, Song WJ, Chung KC (2009b). Function and Regulation of Dyrk1A: Towards Understanding Down Syndrome. *Cell Mol Life Sci* 66: 3235-3240.

Patil N, Peterson A, Rothman A, de Jong PJ, Myers RM, Cox DR (1994). A High Resolution Physical Map of 2.5 Mbp of the Down Syndrome Region on Chromosome 21. *Hum Mol Genet* 3: 1811-1817.

Pawson T, Kofler M (2009) Kinome Signaling Through Regulated Protein-Protein Interactions in Normal and Cancer Cells. *Curr Opin Cell Biol* 21: 147-153.

Pinter JD, Brown WE, Eliez S, Schmitt JE, Capone GT, Reiss AL (2001a). Amygdala and Hippocampal Volumes in Children with Down Syndrome: a High-Resolution MRI Study. *Neurology* 56: 972-974.

Pinter JD, Eliez S, Schmitt JE, Capone GT, Reiss AL (2001b). Neuroanatomical of Down's Syndrome: a High Resolution MRI Study. *Am J Psychiatry* 158: 1659-1665.

R

Rachidi M, Lopes C (2008) Mental retardation and associated neurological dysfunctions in Down syndrome: a consequence of dysregulation in critical chromosome 21 genes and associated molecular pathways. *Eur J Paediatr Neurol* 12: 168-82. Review

Rahmani Z, Blouin JL, Creau-Goldberg N, Watkins PC, Mattei JF, Poissonnier M, Prieur M, Chettouh Z, Nicole A, Aurias A (1989). Critical Role of the D21S55 Region on Chromosome 21 in the Pathogenesis of Down Syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 5958-5962.

Rahmani Z, Lopes C, Rachidi M, Delabar JM (1998) Expression of the Mnb (Dyrk) Protein in Adult and Embryonic Mouse Tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 514-518.

Reeves RH, Irving NG, Moran TH, Wohn A, Kitt C, Sisodia SS, Schmidt C, Bronson RT, Davisson MT (1995) A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat Genet* 11: 177-84.

Reichardt LFN (2006). Eurotrophin-Regulated Signalling Pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 36: 1545-1564.

Rice D, Barone S Jr (2000). Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence From Humans and Animal Models. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 3: 511-533.

Ronan A, Fagan K, Christie L, Conroy J, Nowak NJ, Turner G (2007). Familial 4.3 Mb Duplication of 21q22 Sheds New Light on the Down Syndrome Critical Region. *J Med Genet* 44: 448-451.

Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerriere A, Vital A, Dumanchin C, Feuillette S, Brice A, Vercelletto M, Dubas F, Frebourg T, Campion D (2006) APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet* 38: 24-6

Ryoo SR, Jeong HK, Radnaabazar C, Yoo JJ, Cho HJ, Lee HW, Kim IS, Cheon YH, Ahn YS, Chung SH, Song WJ (2007). DYRK1A-Mediated Hyperphosphorylation of Tau. A Functional Link between Down Syndrome and Alzheimer Disease. *J Biol Chem* 282: 34850-34857.

Ryoo SR, Cho HJ, Lee HW, Jeong HK, Radnaabazar C, Kim YS, Kim MJ, Son MY, Seo H, Chung SH, Song WJ (2008) Dual-specificity tyrosine(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A-mediated phosphorylation of amyloid precursor protein: evidence for a functional link between Down syndrome and Alzheimer's disease. *J Neurochem* 104: 1333-44.

Ryu YS, Park SY, Jung MS, Yoon SH, Kwen MY, Lee SY, Choi SH, Radnaabazar C, Kim MK, Kim H, Kim K, Song WJ, Chung SH (2010) Dyrk1A-mediated phosphorylation of Presenilin 1: a functional link between Down syndrome and Alzheimer's disease. *J Neurochem* 115: 574-84.

S

Sago H, Carlson EJ, Smith DJ, Rubin EM, Crnic LS, Huang TT, Epstein CJ (2000). Genetic Dissection of Region Associated With Behavioral Abnormalities in Mouse Models for Down Syndrome. *Pediatr Res* 48: 606-613.

Sakadamis A, Angelopoulou N, Matziari C, Papameletiou V, Souftas V (2002). Bone Mass, Gonadal Function and Biochemical Assessment in Young Men With Trisomy 21. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 100: 208-212.

Salehi A, Delcroix JD, Belichenko PV, Zhan K, Wu C, Valletta JS, Takimoto-Kimura R et al, (2006). Increased App Expression in a Mouse Model of Down's Syndrome Disrupts NGF Transport and Causes Cholinergic Neuron Degeneration. *Neuron* 51: 29-42.

Sharlow ER, Leimgruber S, Yellow-Duke A, Barrett R, Wang QJ, Lazo JS (2008) Development, validation and implementation of immobilized metal affinity for phosphochemicals (IMAP)-based high-throughput screening assays for low-molecular-weight compound libraries. *Nat Protoc* 3: 1350-63.

Shi Y (2009) Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* 139: 468-84 Review

Shin M, Besser LM, Kucik JE, Lu C, Siffel C, Correa A (2009). Prevalence of Down Syndrome Among Children and Adolescents in 10 Regions of the United States. *Pediatrics* 124: 1565-1571.

Shindoh N, Kudoh J, Maeda H, Yamaki A, Minoshima S, Shimizu Y, Shimizu N (1996). Cloning of a Human Homolog of the Drosophila Minibrain/Rat Dyrk Gene From "the Down Syndrome Critical Region" of Chromosome 21. *Biochem Biophys Res Commun* 225: 92-99.

Shinohara T, Tomizuka K, Miyabara S, Takehara S, Kazuki Y, Inoue J, Katoh M, Nakane H, Iino A, Ohguma A, Ikegami S, Inokuchi K, Ishida I, Reeves RH, Oshimura M (2001). Mice Containing a Human Chromosome 21 Model Behavioral Impairment and Cardiac Anomalies of Down's Syndrome. *Hum Mol Genet* 10: 1163-1175.

Smith D, Stevens ME, Sudanagunta SP, Bronson RT, Makhinson M, Watabe AM, O'Dell TJJ, Fung J, Weier HU, Cheng JF, Rubin EM (1997a) Functional Screening of 2 Mb of Human Chromosome 21q22.2 in Transgenic Mice Implicates Minibrain in Learning Defects Associated With Down Syndrome. *Nat Genet* 16: 28-36.

Smith DJ, Zhu Y, Zhang J, Cheng JF, Rubin EM (1995) Construction of a Panel of Transgenic Mice Containing a Contiguous 2-Mb Set of YAC/P1 Clones From Human Chromosome 21q22.2. *Genomics* 27: 425-434.

Smith DJ, Rubin EM (1997b) Functional Screening and Complex Traits: Human 21q22.2 Sequences Affecting Learning in Mice. *Hum Mol Genet* 6: 1729-1733.

Song WJ, Chung SH, Kurnit DM (1997) The Murine Dyrk Protein Maps to Chromosome 16, Localizes to the Nucleus, and Can Form Multimers. *Biochem Biophys Res Commun* 231: 640-644.

Song WJ, Sternberg LR, Kasten-Sportes C, Keuren ML, Chung SH, Slack AC, Miller DE, Glover TW, Chiang PW, Lou L, Kurnit DM (1996) Isolation of Human and Murine Homologues of the Drosophila Minibrain Gene: Human Homologue Maps to 21q22.2 in the Down Syndrome "Critical Region". *Genomics* 38: 331-339.

Sunderland T (1998) Alzheimer's disease. Cholinergic therapy and beyond. *Am J Geriatr Psychiatry* 6: S56-63. Review

Sureshbabu R, Kumari R, Ranugha S, Sathyamoorthy R, Udayashankar C, Oudeacoumar P (2011) Phenotypic and dermatological manifestations in Down Syndrome. *Dermatol Online J* 17: 3.

T

Takashima S, Iida K, Mito T, Arima M (1994) Dendritic and Histochemical Development and Ageing in Patients With Down's Syndrome. *J Intellect Disabil Res* 38: 265-273.

Tammy C, Turek-Etienne TC, Kober TP, Stafford JM, Bryant RW (2003) Development of a fluorescence polarization AKT serine/threonine kinase assay using an immobilized metal ion affinity-based technology *Assay Drug. Dev Technol* 1: 545-53

Taylor SS, Kornev AP (2011) Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends Biochem Sci* 36: 65-77. Review

Teipel SJ, Alexander GE, Schapiro MB, Moller HJ, Rapoport SI, Hampel H (2004) Age-Related Cortical Grey Matter Reductions in Non-Demented Down's Syndrome Adults Determined by MRI With Voxel-Based Morphometry. *Brain* 127: 811-824.

Tejedor F, Zhu XR, Kaltenbach E, Ackermann A, Baumann A, Canal I, Heisenberg M, Fischbach KF, Pongs O (1995) Minibrain: a New Protein Kinase Family Involved in Postembryonic Neurogenesis in Drosophila. *Neuron* 14: 287-301.

Torfs CP, Bateson TF, Curry CJ (1992). Anorectal and Esophageal Anomalies with Down Syndrome. *Am J Med Genet* 44: 847-850 Review

U

Ubersax JA, Ferrell JE Jr (2007). Mechanisms of Specificity in Protein Phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 530-541.

Unachak K, Tanpaiboon P, Pongprot Y, Sittivangkul R, Silvilairat S, Dejkhamron P, Sudasna J (2008). Thyroid Functions in Children with Down's Syndrome. *J Med Assoc Thai* 91: 56-61.

V

Vicari S, Marotta L, Carlesimo GA (2004). Verbal Short-Term Memory in Down's Syndrome: an Articulatory Loop Deficit? *J Intellect Disabil Res* 48: 80-92.

Vigan (de) (2007) http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/rapport_evaluation_des_strategies_de_depistage_de_la_trisomie_21.pdf

Vis JC, Duffels MG, Winter MM, Weijerman ME, Cobben JM, Huisman SA, Mulder BJ (2009). Down Syndrome: a Cardiovascular Perspective. *J Intellect Disabil Res* 53: 419-425.

W

Wang J, Kudoh J, Shintani A, Minoshima S, Shimizu N (1998). Identification of Two Novel 5' Noncoding Exons in Human MNB/DYRK Gene and Alternatively Spliced Transcripts. *Biochem Biophys Res Commun* 250: 704-710.

Wang D, Wang F, Tan Y, Dong L, Chen L, Zhu W, Wang H (2012) Discovery of potent small molecule inhibitors of DYRK1A by structure-based virtual screening and bioassay. *Bioorg Med Chem Lett* 22: 168-71.

Wegiel J, Dowjat K, Kaczmarek W, Kuchna I, Nowicki K, Frackowiak J, Mazur KB, Wegiel J, Silverman WP et al (2008). The Role of Overexpressed DYRK1A Protein in the Early Onset of Neurofibrillary Degeneration in Down Syndrome. *Acta Neuropathol* 116: 391-407.

Wegiel J, Kuchna I, Nowicki K, Frackowiak J, Dowjat K, Silverman WP, Reisberg B, Deleon M, Wisniewski T, Adayev T, Chen-Hwang MC, Hwang YW (2004). Cell Type- and Brain Structure-Specific Patterns of Distribution of Minibrain Kinase in Human Brain. *Brain Res* 1010: 69-80.

Wegiel J, Gong CX, Hwang YW (2011) The role of DYRK1A in neurodegenerative diseases. *FEBS J* 278: 236-45
Review

White NS, Alkire MT, Haier RJ (2003). A Voxel-Based Morphometric Study of Nondemented Adults With Down Syndrome. *Neuroimage* 20: 393-403.

Wishart JG (1993) The Development of Learning Difficulties in Children With Down's Syndrome. *J Intellect Disabil Res* 37: 389-403.

Wisniewski KE (1990) Down Syndrome Children Often Have Brain With Maturation Delay, Retardation of Growth, and Cortical Dysgenesis. *Am J Med Genet Suppl* 7: 274-281.

Woods YL, Cohen P, Becker W, Jakes R, Goedert M, Wang X, Proud CG (2001) The Kinase DYRK Phosphorylates Protein-Synthesis Initiation Factor EIF2Bepsilon at Ser539 and the Microtubule-Associated Protein Tau at Thr212: Potential Role for DYRK As a Glycogen Synthase Kinase 3-Priming Kinase. *Biochem J* 355: 609-615.

Woods YL, Rena G, Morrice N, Barthel A, Becker W, Guo S, Unterean TG, Cohen P (2001) The Kinase DYRK1A Phosphorylates the Transcription Factor FKHR at Ser329 in Vitro, a Novel in Vivo Phosphorylation Site. *Biochem J* 355: 597-607.

Y

Yamada Y, Watanabe H, Miura F, Soejima H, Uchiyama M, Iwasaka T, Mukai T, Sakaki Y, (2004) Ito T. A Comprehensive Analysis of Allelic Methylation Status of CpG Islands on Human Chromosome 21q. *Genome Res* 14: 247-266.

Yano T, Taura C, Shibata M, Hirano Y, Ando S, Kusubata M, Takahashi T, Inagaki M (1991) A monoclonal antibody to the phosphorylated form of glial fibrillary acidic protein: application to a non-radioactive method for measuring protein kinase activities. *Biochem Biophys Res Commun* 175: 1144-51.

Partie 2

Régulations épigénétiques de l'expression du gène codant ISL1, un facteur essentiel à la différenciation du lignage gonadotrope et à l'expression du récepteur de la GnRH.

Régulations épigénétiques de l'expression du gène codant ISL1, un facteur essentiel à la différenciation du lignage gonadotrope et à l'expression du récepteur de la GnRH.

1 Introduction générale

Le facteur de transcription Islet1 (ISL1) appartient à la famille des protéines LIM à homéodomaine. Ces protéines sont présentes chez tous les Vertébrés et leurs domaines fonctionnels sont étroitement conservés. Elles jouent, pour la plupart, des rôles essentiels dans le développement chez les Mammifères. C'est le cas d'ISL1, impliquée dans de nombreux processus développementaux incluant le développement du pancréas, du système cardiaque, des neurones moteurs de la moelle épinière ou la formation des dents. ISL1 joue également un rôle crucial dans l'ontogenèse hypophysaire, à la fois dans les étapes précoces et plus tardives du développement ainsi que dans le maintien des fonctions différenciées chez l'adulte, notamment le contrôle de la fonction de reproduction qu'assure au sein de l'hypophyse le lignage gonadotrope. Je reviendrai sur les points cités plus haut pour mettre en exergue l'intérêt de ce sujet au regard de la littérature. Auparavant, je décrirai le cadre dans lequel se situe cette étude, l'hypophyse, une glande originale et complexe, dont l'étude a été à l'origine d'une nouvelle branche des Neurosciences, la Neuroendocrinologie. J'évoquerai plus particulièrement le lignage gonadotrope, l'un des six lignages endocrines hypophysaires. Les cellules formant ce lignage expriment des gènes spécifiques, marqueurs de l'état différencié de ces cellules, en particulier celui codant pour le récepteur de la GnRH (GnRHR). Ce récepteur constitue l'un des agents majeurs du contrôle de la fonction de reproduction par sa capacité à décoder les signaux émis par son ligand hypothalamique et à les traduire en modulant de manière différentielle la sécrétion de LH et de FSH. L'analyse des mécanismes impliqués dans l'expression du gène du récepteur (*Gnrhr*) a permis de démontrer qu'il constituait l'une des cibles privilégiée d'ISL1 dans l'hypophyse, faisant de ce facteur de transcription un nouvel acteur de la mise en place et du maintien de la fonction gonadotrope. Dans les étapes précoces de l'ontogenèse hypophysaire, à 8,5 jours de développement

embryonnaire (E8.5) chez la souris, ISL1 s'exprime dans l'ensemble des cellules destinées à former l'hypophyse. Plus tard, vers 10,5 jours de développement (E10.5), l'expression de son gène se restreint aux cellules qui peuplent la partie ventrale de l'hypophyse et, chez l'adulte, il s'exprime dans les cellules gonadotropes, probablement de manière non exclusive. Les mécanismes qui président à l'expression de ce gène à ces différents stades de développement reflètent vraisemblablement différentes facettes des régulations génétiques et épigénétiques. C'est ce que nous avons commencé à décrypter au cours de cette étude.

Dans cette introduction, nous décrirons le complexe hypothalamo-hypophysaire sur le plan anatomique et fonctionnel, la découverte historique des neurohormones hypothalamiques, le système GnRH/GnRH récepteur sous ses divers aspects physiologiques et moléculaires avant de présenter ISL1, une protéine LIM à homéodomaine découverte en 1990 (Karlsson et al) et d'évoquer la place essentielle qu'elle tient dans le développement de plusieurs tissus. Nous concluons cette introduction par une présentation des modifications épigénétiques, modifications des histones et méthylation de l'ADN, susceptibles d'affecter les gènes d'*Isl1* et du récepteur de la GnRH. La mise en évidence de ces modifications sur ces gènes constitue le sujet essentiel de cette partie de thèse et apporte un nouvel éclairage sur les régulations géniques au cœur de la fonction gonadotrope.

1.1 Le complexe hypothalamo-hypophysaire

Le contrôle étroit que le système nerveux central exerce sur le fonctionnement des gonades est indispensable pour le déroulement physiologique normal de la fonction de la reproduction chez les Mammifères. Cette régulation s'établit *via* le complexe hypothalamo-hypophysaire. Ce dernier est formé de l'hypophyse, une glande située à la base du cerveau au-dessus de l'os sphénoïde et de la voûte que constitue le palais. Cette glande endocrine joue un rôle majeur non seulement dans la fonction de reproduction mais également dans plusieurs grandes fonctions physiologiques comme la lactation, la croissance, le métabolisme, le développement et la réponse au stress. L'hypophyse est directement reliée à l'hypothalamus par la tige pituitaire.

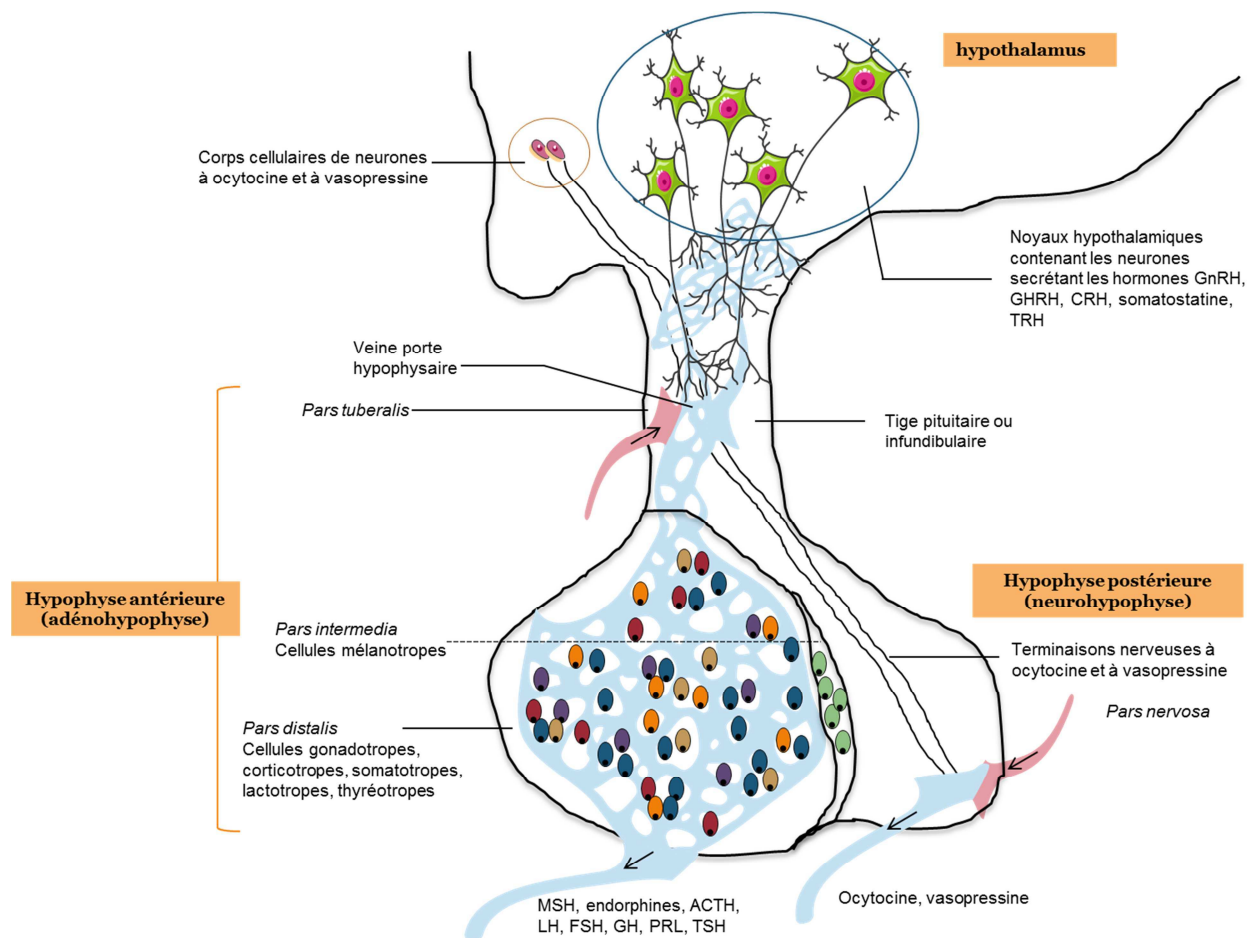


Figure 1
L'axe hypothalamo-hypophysaire chez les Mammifères

L'axe hypothalamo-hypophysaire est constitué de l'hypothalamus et de l'hypophyse. L'hypophyse est une glande composée de deux lobes qui sont d'origine embryonnaire différente : le lobe postérieur est d'origine nerveuse et le lobe antérieur d'origine glandulaire. L'hypophyse postérieure ou la neurohypophyse est divisée en deux régions : l'*infundibulum* ou la tige pituitaire et le lobe postérieur ou *pars nervosa* qui contient les terminaisons nerveuses des neurones à vasopressine et ocytocine. Les corps cellulaires de ces neurones sont localisés dans les noyaux supra optiques (SON) et paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus. L'hypophyse antérieure ou l'adénohypophyse est divisée en trois régions : la *pars intermedia*, dans laquelle se trouvent majoritairement les cellules mélanotropes qui produisent la MSH et les endorphines, la *pars tuberalis* et la *pars distalis*, où se situent les cinq autres types cellulaires hypophysaires : les cellules gonadotropes qui produisent et libèrent la LH et la FSH, les cellules corticotropes qui produisent et libèrent l'ACTH, les cellules lactotropes qui produisent et libèrent la prolactine, les cellules somatotropes qui produisent et libèrent la GH et les cellules thyrotropes qui produisent et libèrent la TSH. L'hypothalamus et l'hypophyse antérieure sont reliés indirectement par l'intermédiaire de neurohormones régulant l'activité des hormones hypophysaires. Parmi elles, la CRH, la somatostatine, la TRH et la GnRH. Ces neurohormones sont déversées dans le système porte hypothalamo-hypophysaire au niveau de la tige pituitaire et se fixent sur leur récepteur respectif dans l'adénohypophyse. Le GnRH s'exprime exclusivement à la surface des cellules gonadotrope

1.1.1 Anatomie fonctionnelle de l'hypophyse

Le complexe hypothalamo-hypophysaire intègre des informations d'origine diverse, internes et externes à l'organisme, et émet en réponse des signaux hormonaux finement modulés, destinés à réguler l'activité des organes et parvenir à un fonctionnement physiologique optimal.

L'hypophyse est composée de deux parties d'origine embryonnaire différente (Scully et Rosenfeld, 2002 ; pour revue Catala et Trouillas, 2006) : l'adénohypophyse ou hypophyse antérieure et la neurohypophyse ou hypophyse postérieure. L'adénohypophyse provient de l'ectoderme de surface qui par la suite deviendra le toit du pharynx primitif ou *stomodeum* (Kouki et al, 2001). Ce dernier donnera naissance à la poche de Rathke dont les cellules vont se différencier sous l'influence de gradients morphogénétiques constitués par des signaux extra-hypophysaires de facteurs de croissance et de protéines morphogènes (FGF8, BMP4, BMP2) (Scully and Rosenfeld, 2002). L'adénohypophyse adulte est divisée en trois parties morphologiquement distinctes (**Figure 1**) : la *pars tuberalis*, la *pars distalis* et la *pars intermedia*. La première se situe dans la partie rostrale et entoure la tige pituitaire. La seconde constitue la partie la plus importante de l'hypophyse glandulaire. La troisième partie ou *pars intermedia* ou encore lobe intermédiaire ou cystiforme régresse chez les Primates pour devenir quasiment absente chez l'Homme. Cette adénohypophyse est constituée de six types cellulaires endocrines : les cellules gonadotropes, thyrotropes, somatotropes, lactotropes, corticotropes et mélanotropes qui respectivement synthétisent et sécrètent les hormones gonadotropes - hormone lutéinisante ou LH et hormone folliculo-stimulante ou FSH -, l'hormone thyrotrope (TSH), l'hormone de croissance (GH), la prolactine (PRL), l'hormone corticotrope (ACTH) et l'hormone mélanotrope (MSH). Chacune de ces hormones est libérée dans la circulation sanguine afin d'agir sur ses organes cibles en fonction des informations nerveuses provenant de l'hypothalamus. Un septième type cellulaire, non sécrétant, les cellules folliculo-stellaires, exprime des marqueurs de cellules gliales, la protéine S-100 et la GFAP (Vila-Porcile, 1972 ; Fauquier et al, 2001). Elles pourraient constituer un système de communication intercellulaire hypophysaire et/ou s'apparenter à des cellules souches (Inoue et al, 2002), participant ainsi à certaines fonctions hypophysaires.

La neurohypophyse ou hypophyse postérieure (**Figure 1**) est d'origine neuroectodermique. Ces cellules proviennent de la plaque neurale médiane qui formera le

plancher du diencéphale (Couly et al, 1987 ; Rubenstein et al, 1998 ; Cobos et al, 2001). Elle est divisée en trois régions. Le lobe postérieur ou *pars nervosa* est relié à l'hypothalamus par l'éminence médiane et la tige infundibulaire ou pituitaire. La neurohypophyse contient essentiellement des cellules gliales dites pituicytes et les terminaisons nerveuses des neurones hypothalamiques à vasopressine ou hormone antidiurétique et à ocytocine. Ces hormones sont synthétisées par les neurones des noyaux supraoptiques (SON) et paraventriculaires (PVN) de l'hypothalamus (Okado et al, 1980 ; Kiuoussi et al, 1999).

1.1.2 Mise en évidence du contrôle neuro-hormonal

C'est au début des années 1950 que l'hypothèse d'un contrôle neuro-hormonale de l'hypophyse antérieure par l'hypothalamus fut proposée par Georges Harris et Jacques Benoit. Ce contrôle, selon leur intuition d'alors, était chimique. Ils ont donc émis l'hypothèse qu'il existait une communication chimique entre les cellules nerveuses, ce qui remettait en cause la thèse soutenue et difficile à détrôner à l'époque qui postulait que la seule communication possible entre les cellules nerveuses s'établissait par des influx électriques.

Cette hypothèse fut fondée sur des observations que fit G.Sayers en 1947 chez le rat en état de stress. Il observa une régulation de l'hypophyse par une molécule polypeptidique l'adrénocorticotrophine ou ACTH (Sayers et al, 1947). A la suite de cette observation, plusieurs scientifiques comme Claude Fortier, Roger Guillemin ou Andrew Schally furent de plus en plus convaincus de l'existence d'un contrôle autre qu'électrique au niveau hypophysaire (Fortier, 1952 ; Guillemin et al, 1955 ; Saffran et Schally, 1955). Néanmoins, ce fut Georges Harris et Jacques Benoit qui, lors d'observations chez le rat, apportèrent les premières conclusions. Chez le rat, après ablation totale de l'hypophyse et transplantation d'hypophyse fœtale, les femelles ne se voyaient restaurer leur fertilité que si l'hypophyse transplantée était reliée à l'hypothalamus par la tige pituitaire. Harris qualifiait ce lien de contrôle humoral hypothalamique (Harris et Jacobsohn 1952) lequel fut observé à nouveau grâce aux expériences réalisées par Jacques Benoit la même année (Benoit et Assenmacher, 1952). Ces derniers découvrirent que ce message chimique partait de l'hypothalamus pour atteindre l'hypophyse par l'intermédiaire d'un système de communication vasculaire, donc non nerveux, le système porte hypothalamo-hypophysaire.

1.1.3 Découverte des neurohormones hypothalamiques

Plusieurs neurohormones hypothalamiques hypophysiotropes furent découvertes entre 1955 et 1981. La première, en 1955, fut la corticolibérine (CRF puis CRH en 1981), responsable de la libération de l'ACTH (Fortier et al, 1955). La somatostatine ou SRIF quant à elle fut découverte en 1973. La production hypophysaire de la LH et la FSH ainsi que leurs incidences sur les gonades ont été mises en évidence dans les années 1930. L'implication de l'hypothalamus et du système nerveux central dans la régulation gonadique, et donc de la reproduction, fut identifiée entre les années 1940 et 1950 et c'est seulement en 1971 que fut caractérisée, par R. Guillemin et par A. Schally, la gonadolibérine ou GnRH mammalienne, un décapeptide de formule $\text{pyroGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-CONH}_2$, responsable de la libération de la FSH et la LH, (Amoss et al, 1971; Matsuo et al, 1971). Cette découverte fut précédée par celle de la thyrolibérine ou TRH en 1965, un tripeptide de formule $\text{pyroGlu-His-ProNH}_2$, responsable de la libération de l'hormone thyroïdienne. Ce fut le premier peptide hypothalamique identifié ce qui a permis par la suite de déchiffrer le fonctionnement de l'axe hypothalamo-thyroïdien ainsi que les pathologies afférentes à cet axe. La découverte de la GnRH permettra quelques années plus tard d'orienter les recherches sur les pathologies touchant l'axe gonadotrope, tout particulièrement l'infertilité et la stérilité. Ces découvertes successives des neurohormones et du système porte hypothalamo-hypophysaire qui portaient de l'intuition qu'il existait un contrôle chimique de l'hypophyse par l'hypothalamus furent approfondies par l'apparition de techniques de dosage plus précises. En 1977, Roger Guillemin et Andrew Schally reçurent le prix Nobel de physiologie et médecine, qu'ils partagèrent avec Rosalyn Yalow, une physicienne qui mit au point une méthode de dosage par radio-immunologie permettant de détecter et de doser les hormones hypothalamiques en petites quantités. Quant à l'ocytocine et la vasopressine, deux neurohormones sécrétées par les neurones hypothalamiques dans la circulation sanguine au niveau du lobe postérieur de la neurohypophyse, elles furent découvertes également dans les années 1950 par Vincent du Vigneaud, prix Nobel de chimie en 1955.

La mise en évidence par l'hypothalamus, *via* des neurohormones spécifiques, du contrôle des sécrétions hypophysaires qui ensuite agissent spécifiquement sur leurs organes cibles, a permis l'élaboration d'analogues synthétiques autorisant la prise en charge mieux

adaptée des pathologies endocriniennes et conduisant à mettre au point de nouvelles approches thérapeutiques en cancérologie avec la mise en place de chimiothérapies ciblées.

1.1.4 L'hypophyse, une invention évolutive des Vertébrés

Les découvertes faites depuis les cinquante dernières années concernant l'hypothalamus, l'hypophyse, leurs liens et les différentes façons que ce complexe utilise pour communiquer avec divers organes y compris le cerveau, ont conduit plusieurs équipes à s'intéresser à l'évolution de celle-ci.

Cette organisation tripartite (hypothalamus, hypophyse, organes), telle qu'elle est connue dans toute sa complexité, constitue une invention évolutive des Vertébrés. Si l'on se restreint au contrôle de la reproduction, le processus évolutif qui a abouti à l'établissement de l'axe gonadotrope au cours du temps inclut l'émergence de l'hypophyse, structure faisant le lien entre le système nerveux central et les gonades. Si l'on se réfère à l'ensemble du règne animal, la gonadolibérine (GnRH) et son récepteur sont présents chez les Bilatériens avant la séparation des Deutérostomes et des Protostomes (Tsai, 2006). En revanche, plusieurs études montrent que chez les Urochordés, dont la Cione, et les Céphalochordés, comme l'Amphioxus, les gènes codant les hormones antéhypophysaires sont manquants (Campbell et al, 2004, Dos Santos et al, 2009). Il n'existe donc pas d'hormone hypophysaire ni de structure apparentée à l'hypophyse telle que l'on peut la connaître chez les Vertébrés. Chez les Mollusques, comme l'huître creuse, il existe un récepteur à la GnRH ressemblant à celui des Vertébrés mais exprimé au niveau des gonades mâles et femelles (Rodet et al, 2005) et l'expression de ce récepteur semble être régulée au cours du cycle de la reproduction, suggérant un rôle dans le contrôle de la ponte. Chez Aplysia et Helisoma, d'autres Mollusques, la GnRH stimule la libération des gamètes.

L'hypophyse apparaît avec les Vertébrés (Nozaki et al, 2001). C'est une structure délimitée, avec tous les types cellulaires que l'on trouve déjà chez les Cyclostomes comme la lamproie et les myxines, avec un système vasculaire permettant la communication entre l'hypothalamus et l'hypophyse. Le système porte hypothalamo-hypophysaire est présent chez les Vertébrés à mâchoires, les Gnathostomes, à l'exception des poissons Téléostéens où ce système a régressé. Dans ce cas particulier, on observe une innervation directe du tissu hypophysaire par les terminaisons nerveuses des neurones hypothalamiques (Lovejoy, 2006).

Au sein même des Vertébrés, le système hypothalamo-hypophysaire va subir des modifications et va se complexifier chez les Mammifères, chez les Primates et chez l'Homme pour donner cette structure intégrant des informations de diverses origines pour les traiter et les relayer par des signaux hormonaux destinés aux organes cibles.

L'axe gonadotrope (**Figure 2**) comprend le système hypothalamo-hypophysaire qui constitue le centre intégrateur, la circulation sanguine générale qui transporte les hormones et constitue la voie de communication et enfin les gonades qui sont les organes cibles. Les cellules antéhypophysaires qui dialoguent avec les gonades sont les cellules gonadotropes (Treier et Rosefeld, 1996). Elles représentent environ 15% des cellules de l'adénohypophyse. C'est vers la 15^{ème} semaine de développement (SD) chez le fœtus féminin humain et la 20^{ème} SD chez le fœtus masculin humain, que les sous-unités β de la LH et de la FSH sont détectées alors que la sous-unité α (CGA) commune aux hormones FSH, LH et TSH est détectée dès la 8^{ème} SD (Asa et al, 1986 ; pour revue Catala et Trouillas, 2006). Les cellules gonadotropes reçoivent les informations émises par des neurones localisés dans les noyaux arqués hypothalamiques qui libèrent la GnRH au niveau de la *pars intermedia* dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. Le GnRH vient se fixer sur son récepteur spécifique au sein des membranes plasmiques des cellules gonadotropes et ainsi stimule la sécrétion des hormones gonadotropes et active la transcription des gènes des sous-unités β de la LH et la FSH et de la sous-unité α ainsi que celle du gène codant son propre récepteur (**Figure 2**). La LH et la FSH sont synthétisées et libérées en fonction de la fréquence et de l'amplitude des pulses de GnRH. Cette dernière est elle-même contrôlée par les hormones sexuelles qui exercent des rétrocontrôles *via* la circulation sanguine générale.

Chez la femme, le rôle principal de l'hormone lutéinisante est de déclencher l'ovulation survenant 36 à 48 heures après un pic ou décharge ovulante de LH provoqué par un rétrocontrôle positif de l'œstradiol-17 β . La LH permet avec la FSH la maturation folliculaire et la transformation du follicule rompu en corps jaune pendant la phase lutéale du cycle menstruel ainsi que la synthèse de progestérone et d'œstrogènes par le corps jaune après l'ovulation. Chez l'homme, la LH stimule la production de la testostérone par les cellules interstitielles du testicule, les cellules de Leydig.

L'hormone folliculo-stimulante chez la femme a pour rôle principal de stimuler les cellules de la granulosa qui sécrètent de l'œstradiol et de l'inhibine B et expriment à leur surface des récepteurs spécifiques de la LH. Ces mêmes cellules produisent également une aromatasase afin de convertir les androgènes en œstrogènes et permettre l'ovulation. Chez l'homme, la FSH stimule les cellules de Sertoli qui, à leur tour, vont sécréter de l'inhibine B pour la spermatogénèse.

La GnRH contrôle les processus permettant le développement du follicule ovarien, l'ovulation, le maintien du corps jaune au cours du cycle menstruel chez la femme et la spermatogénèse chez l'homme. La testostérone, la progestérone et les œstrogènes vont en retour réguler le taux de GnRH libéré en agissant par rétrocontrôle positif ou négatif sur l'hypothalamus et l'hypophyse. L'une des questions importantes concerne les mécanismes restreignant l'expression de récepteur de la GnRH aux seules cellules gonadotropes au sein de l'hypophyse antérieure. Ces mécanismes sont essentiels puisqu'ils participent majoritairement à la mise en place de la spécificité de la fonction gonadotrope et qu'ils sont liés, directement ou indirectement, aux processus de différenciation hypophysaire.

Parmi les Vertébrés, notamment chez les poissons, les amphibiens et les oiseaux, il existe plusieurs formes de GnRH associées à plusieurs types de récepteurs. Néanmoins, les Mammifères expriment de manière quasi exclusive le récepteur au GnRH de type 1 et c'est à celui-ci que nous nous référerons sous l'appellation générale de GnRHR (et de GnRH pour son ligand) tout au long de ce mémoire.

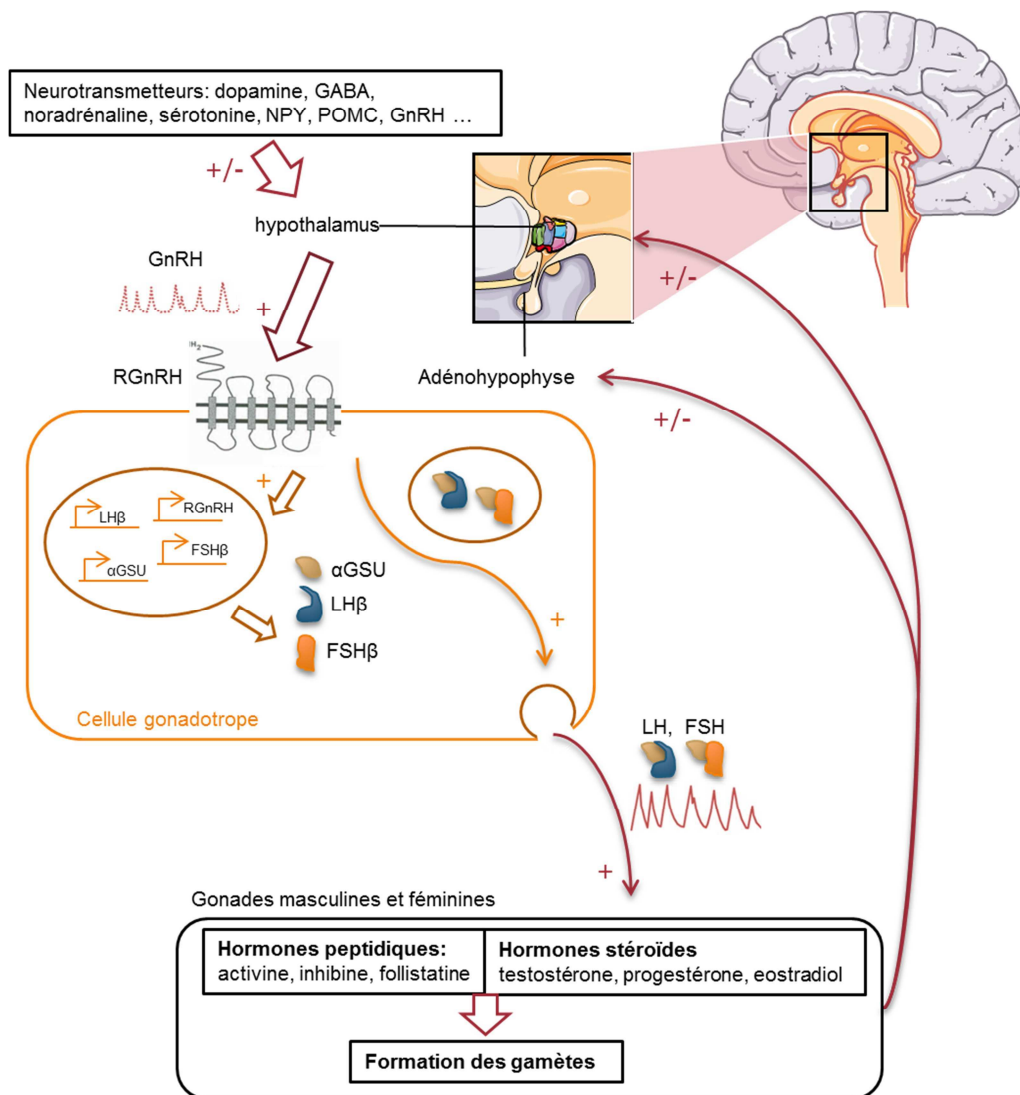


Figure 2
L'axe gonadotrope chez les Mammifères

La GnRH, libérée de façon pulsatile dans le système porte, se fixe sur son récepteur à 7 domaines transmembranaires situé à la surface des cellules gonadotropes. L'activation de la protéine G trimérique liée au GnRHR transduit le signal *via* les voies de signalisation et favorise l'activité transcriptionnelle des gènes *Cga* (α GSU), *Lhβ*, *Fshβ* et *Gnrhr*. La LH et la FSH, libérées de façon pulsatile dans la circulation générale jusqu'aux gonades, stimulent la synthèse des hormones stéroïdiennes telles que l'œstradiol, la progestérone, la testostérone ainsi que des hormones peptidiques comme l'activine, l'inhibine ou la follistatine. Ces hormones permettent la formation des gamètes et exercent des rétrocontrôles positifs ou négatifs sur la synthèse des hormones hypophysaires et neurohormones hypothalamiques

1.2 La GnRH

La GnRH présente une structure tridimensionnelle en épingle à cheveux dont les extrémités N et C terminales participent à l'interaction avec le récepteur de la GnRH (GnRHR). Ses extrémités sont modifiées par cyclisation de la glutamine en acide pyroglutamique et amidation du groupement carboxyle terminal protégeant la GnRH des protéases telles que l'aminopeptidase et la carboxypeptidase (pour revue Caraty et al, 2001 ; pour revue Millar et al, 2004). Le gène humain de la GnRH se situe sur le chromosome 8. Il code un précurseur de 92 acides aminés, le pré-pro-GnRH qui contient la GnRH et le peptide GAP. Ce précurseur subit des modifications post-traductionnelles avec pour conséquence le clivage et l'élimination d'acides aminés basiques en C terminal et la cyclisation de ses deux extrémités.

1.2.1 Les neurones à GnRH

La GnRH et le peptide GAP, dont le rôle est encore mal connu, sont stockés dans des vésicules de sécrétion (pour revue Caraty et al, 2001) localisées dans les terminaisons nerveuses des neurones à GnRH hypothalamiques situés dans l'aire préoptique chez la plupart des Mammifères et dans l'hypothalamus médio-basal chez les Primates. Ces neurones à GnRH, de type parvocellulaires, sont petits avec un noyau condensé et leur distribution est diffuse. Ils sont peu nombreux, environ 2.000 chez l'Homme (pour revue Beauvillain, 2008). Ces neurones ont été mis en évidence par l'observation de patients atteints d'un syndrome associant hypogonadisme et anosmie (perte de l'olfaction). Ce syndrome fut défini par Franz-Josef Kallmann en 1944. Son incidence est de 1/10.000^e (Schwanzel-Fukada et Pfaff, 1989 ; pour revue Bianco et Kaiser, 2009). Ces observations ont permis de mettre en évidence l'origine de ces neurones. Durant le développement embryonnaire, les neurones à GnRH migrent depuis le compartiment nasal le long des nerfs olfactifs jusqu'à la plaque cribriforme et divergent vers une région plus caudale du cerveau antérieur pour atteindre leur destination finale dans l'hypothalamus (Schwanzel-Fukada et Pfaff, 1990 - pour revue 1999 ; Duittoz et al, 1998). Ces neurones émettent des prolongements axonaux le long de l'éminence médiane vers le système porte hypothalamo-hypophysaire afin de relarguer la GnRH dans la circulation sanguine pour atteindre l'adénohypophyse où elle se fixe sur son récepteur à la

surface des cellules gonadotropes. Ce décapeptide est sécrété dans le système porte de façon pulsatile induisant une sécrétion également pulsatile de LH.

1.2.2 La pulsatilité de la GnRH et ses conséquences

La pulsatilité de la GnRH a un rôle essentiel dans le maintien de la fonction gonadotrope et donc de la reproduction. La pulsatilité de la GnRH entraîne la pulsatilité des gonadotropines. Lorsque des cellules hypothalamiques (GT1-7) sont mises en culture, cette pulsatilité est conservée et l'ensemble des neurones sécrète de façon synchronisée la GnRH, formant un réseau fonctionnel appelé « générateur de pulses de GnRH » (Knobil, 1990 ; pour revue Weiner et al, 1992). En 1971, lors de la découverte de la GnRH, il fut observé que des injections intraveineuses de 100 mg de GnRH entraînaient une libération massive de LH et de FSH. Ces observations furent confirmées lors d'expériences sur le macaque (Belchetz et al, 1978) atteint d'hypogonadisme-hypogonadotrope. En revanche, une administration continue et massive de GnRH inhibe la sécrétion des gonadotropines. Des expériences chez le mouton ont révélé qu'un pulse de GnRH entraînait un pulse de LH détectable dans la circulation sanguine (Clarke et Cumming, 1982). Knobil, dans les années 1990, montra chez le macaque qu'une perfusion en continue de GnRH supprime la sécrétion des gonadotropines et que la pulsatilité de chaque neurone à GnRH est synchronisée avec celle de tous les autres (Knobil, 1990). Il a montré également qu'une injection pulsatile de GnRH induit une puberté précoce. Parmi les périodes de la vie humaine, la période fœtale, la période post-natale jusqu'à 2 ans et la période pubertaire sont des périodes où la LH et la FSH sont sécrétées et jouent un rôle déterminant. En revanche, il existe une phase durant l'enfance où le complexe hypothalamo-hypophysaire semble quiescent. Ce serait la conséquence d'une inhibition de l'amplitude des pulsations. La levée de cette inhibition permet l'entrée en puberté. Les pulses de GnRH durent quelques dizaines de minutes, espacés d'un intervalle de temps compris entre 30 à 120 minutes. Les fréquences des pulses contrôlent l'activation sélective de certaines voies de signalisation après la liaison de la GnRH sur son récepteur. Ces découvertes ont des répercussions importantes en médecine humaine et clinique. L'utilisation de pompes pulsatiles à GnRH (Pitteloud et al, 2002) permet de traiter les déficits hypothalamiques comme le Syndrome de Kallmann. Au contraire, l'administration continue d'agonistes de la GnRH à action prolongée freine la sécrétion des gonadotropines et facilite les manipulations pharmacologiques de l'ovulation dans le cadre des pubertés précoces (Boepple et al, 1990 ;

Lahlou et al, 2000). Ces traitements sont également utilisés dans les cas des cancers hormonaux-dépendants (Emons et Schally, 1994 ; Vacher, 1995) et, plus généralement, pour réguler les troubles endocriniens (Cedars et al, 1990).

1.2.3 Les régulations de la GnRH

La sécrétion de la GnRH est modulée par différents facteurs d'origines et de natures diverses. Les hormones stéroïdes gonadiques, dont la testostérone, la progestérone et les œstrogènes, régulent la synthèse et la libération de la GnRH en agissant sur les neurones à GnRH par des rétrocontrôles positifs ou négatifs. Chez l'homme, la testostérone exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de la GnRH (Matsumoto et Bremner, 1984 ; Emmelot-Vonk et al, 2008). Les œstrogènes exercent un rétrocontrôle négatif sur le complexe hypothalamo-hypophysaire. En revanche, chez la femme, au moment de la période précédant le pic pré-ovulatoire de LH et de FSH, ils exercent un rétrocontrôle positif. Cette période correspond à la phase folliculaire chez l'humain et pro-œstrus chez les rongeurs (pour revue Herbison et Pape, 2001).

Les hormones stéroïdes semblent également agir *via* des rétrocontrôles positifs ou négatifs sur d'autres neurones qui agiront eux-mêmes sur les neurones à GnRH. Les neurones à kisspeptides en sont un exemple. Ces derniers relayeraient l'action de la leptine sur la sécrétion de la GnRH (Smith et al, 2006). La leptine est une hormone peptidique produite par le tissu adipeux dont l'un des rôles est de rendre compte au système nerveux central de l'état et de la qualité des réserves énergétiques du tissu adipeux (Watanobe, 2002 ; pour revue Pineda et al, 2010). La fonction de reproduction nécessitant un apport énergétique important, elle se trouve affectée si les réserves sont insuffisantes (pour revue Martin et al, 2008) jusqu'au point d'être bloquée. D'autres études récentes révèlent que la sécrétion des gonadotrophines peut être inhibée par d'autres hormones comme la « Gonadotropin Inhibitory Hormone » ou GnIH (pour revue Tsutsui et al, 2010). Ces études révèlent également que les cellules gliales, astrocytes et tanocytes au niveau de l'éminence médiane, contrôlent la libération de la GnRH dans la circulation sanguine (Prevost et al, 1999 ; pour revue Ojeda et al, 2008). Il existe donc plusieurs modes de régulation de la sécrétion de GnRH s'exerçant à différents niveaux.

1.3 Le récepteur de la GnRH (GnRHR).

La GnRH est une neurohormone qui emprunte le système porte hypothalamo-hypophysaire afin d'atteindre son récepteur spécifique, exprimé à la surface des cellules gonadotropes. Le GnRHR appartient à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (Lefkowitz, 1998). Les informations obtenues après clonage de l'ADN complémentaire, isolé dans plusieurs espèces de Mammifères, se sont révélées précieuses pour établir la séquence protéique au début des années 1990 et, par la suite, sa structure. Cette séquence a été caractérisée en premier chez la souris à partir de la lignée gonadotrope immortalisée α T3-1 (Tsutsumi et al, 1992 ; Reinhart et al, 1992), puis chez l'Homme (Kakar et al, 1992 ; Chi et al, 1993), chez le rat (Reinhart et al, 1992 ; Perrin et al, 1993 ; Kakar et al, 1994a), ainsi que chez d'autres espèces. Il est intéressant de noter que les séquences d'ADN complémentaires présentent 85% d'identité entre elles (Baldwin, 1993). Ceci illustre une forte pression de sélection au cours de l'évolution et l'importance de ce récepteur dans le bon fonctionnement de plusieurs fonctions physiologiques, notamment la fonction de reproduction (Davidson et al, 1994a).

1.3.1 Séquence et structure du GnRHR.

La structure primaire de la protéine chez l'humain comporte 328 acides aminés, un acide aminé de plus que chez les rongeurs (Kakar et al, 1992 ; pour revue Millar et al, 2004). L'acide aminé additionnel est une lysine en position 191 (Arora et al, 1999). Chez les rongeurs, l'extrémité N-terminale extracellulaire présente deux sites de glycosylation alors qu'un seul est présent dans la séquence humaine (Davidson et al, 1995). Ces sites de glycosylation ont leur importance quant au recrutement des récepteurs. Lorsque ces sites sont supprimés, le nombre des récepteurs recrutés à la surface des cellules diminue (Davidson et al, 1996).

L'appartenance du GnRHR à la famille de récepteurs à sept domaines transmembranaires fut prédite bien avant de connaître sa structure (Baldwin, 1993 ; Ballesteros et al, 1998). Elle fut déduite de sa capacité à activer des voies de signalisation intracellulaire communes à d'autres récepteurs de cette famille. Ces voies de signalisation activées par le GnRHR, hautement amplificatrices, sont variées (Baldwin, 1993 ; Ballesteros

et Palczewski, 2001). La structure secondaire des récepteurs couplés aux protéines G dérive d'une seule et unique chaîne polypeptidique, caractéristique partagée par le GnRHR. Les sept domaines transmembranaires hydrophobes sont connectés entre eux par des boucles hydrophiles extracellulaires et intracellulaires (Baldwin, 1993). Cette structure est stabilisée par deux ponts disulfures : le premier est situé entre la première boucle extracellulaire (Cys114 chez l'humain) et la deuxième boucle extracellulaire (Cys195 chez l'humain) et l'autre entre l'extrémité N-terminale (Cys14 chez l'humain) et la deuxième boucle extracellulaire (Cys199 chez l'humain) (Kakar et al, 1992 ; Cook et Eidne, 1997 ; pour revue Millar et al, 2004). Les sept hélices forment une poche hydrophile où les hélices 1,2 et 7 sont proches les unes des autres (Baldwin, 1993 ; pour revue Millar et al, 2004). La liaison du GnRH à son récepteur provoque un changement de conformation et active la protéine G couplée induisant une cascade de signalisation. Les résidus conservés et impliqués dans l'internalisation, l'interaction avec la GnRH, la transduction du signal et les interactions avec d'autres protéines ont été identifiés par des expériences de mutagenèse dirigée et par modélisation (pour revue Millar et al, 2004). Ainsi la lysine en position 191 serait impliquée dans l'internalisation du récepteur (Arora et al, 1999) et l'asparagine en position 18 chez l'humain porte le site de glycosylation (Davidson et al, 1995). Certains acides aminés très conservés comme l'Asn53, Trp164, Ser167, Asn315 et Tyr323 jouent un rôle dans la transduction du signal (Zhang et Weinstein, 1994). La liaison de la GnRH à son récepteur s'effectue *via* l'Arg8 de la GnRH (Karten et Rivier, 1986 ; Hazum, 1987), chargé positivement (King et al, 1992) et la Glu301 (Flanagan et al, 1994). Le domaine N-terminal du GnRHR mammalien intervient dans la liaison avec la GnRH ainsi que l'Asn102 qui lie l'extrémité C-terminal de la GnRH (Davidson et al, 1996b). Enfin, la modélisation tridimensionnelle a permis de mettre en évidence la liaison entre le Trp279 du GnRHR et le Trp3 de la GnRH (Chauvin et al, 2000).

Il est intéressant de noter que le GnRHR se différencie des autres récepteurs de la famille des récepteurs couplés aux protéines G par l'absence de domaine C-terminal intracellulaire (Tsutsumi et al, 1992 ; Kakar et al, 1992 ; Conn et al, 1995), essentiel pour la désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G. Ce domaine contient des résidus cystéines susceptibles d'être palmitoylés, ainsi que d'autres résidus pouvant subir des phosphorylations. L'ensemble de ces modifications permet la désensibilisation du récepteur et son internalisation (Sibley et al, 1987 ; Zhu et al, 1995). L'importance de l'absence de

domaine C-terminal a été illustrée par des expériences sur les lignées cellulaires hypophysaires α T3-1 (Davidson et al, 1994b ; Anderson et al, 1995 ; McArdle et al, 1996). C'est une caractéristique que partagent tous les Mammifères (pour revue Millar et al, 2004) à la différence de toutes les autres espèces non mammaliennes qui possèdent un domaine C terminal de 51 acides aminés (Illing et al, 1999 ; Wang et al, 2001) où la désensibilisation et l'internalisation des récepteurs s'avèrent plus rapides (Blomenrohr et al, 1997 ; Pawson et al, 1998) *via* des vésicules à clathrines (McArdle et al, 1999).

1.3.2 Les voies de signalisation couplées au récepteur de la GnRH

La liaison de la GnRH à son récepteur provoque l'activation de la protéine G trimérique couplée à celui-ci et la transduction du signal se propage *via* différentes voies de signalisation (**Figure 3**). Ce qui a pour conséquence l'activation de la transcription de plusieurs gènes dont ceux codant la CGA, la LH β , la FSH β , et le GnRHR. Très brièvement, je rappellerai ici des études récentes illustrant les liens entre les effets physiologiques induits par la GnRH et les caractéristiques de durée, de fréquence et d'amplitude de sa sécrétion (pour revue Kakar et al, 2004 ; Larivière et al, 2007 et 2008 ; pour revue Counis et al, 2009).

Plusieurs voies de signalisation participent à la transduction du signal et induisent la transcription des gènes cibles. La voie de la phospholipase C β (PLC β) est stimulée par l'activation des protéines G α_q /G α_{11} qui semblent être les protéines G les plus fréquemment couplées au GnRHR (Hsieh et Martin, 1992 ; Grosse et al, 2000a). La PLC β catalyse la transformation du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) en diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate (IP3). Ce dernier agit sur le réticulum endoplasmique pour mobiliser le Ca²⁺ intracellulaire tandis que le DAG provoque la translocation des protéines kinases C à la membrane (PKC), qui, à leur tour, activent les voies des MAP kinases (ERK, JNK et P38) et stimulent l'entrée de Ca²⁺ extracellulaire dans la cellule en activant les canaux calciques dépendants du voltage. L'accumulation de Ca²⁺ provoque l'exocytose des vésicules contenant les gonadotropines (Sundaresan et al, 1996 ; pour revue Naor et al, 2000). L'activation de la voie des MAP kinases par les PKCs induit la transcription de la sous-unité α commune à la LH, à la FSH et à la TSH (Shacham et al, 2001 ; pour revue Naor et al, 2000) ainsi que les sous-unités β de la LH et de la FSH. L'activation du GnRHR stimule la voie des MAP kinases comprenant JNK (Roberson et al, 1999) et p38MAPK (Haisenleder et al, 1998) mais

également la voie des MAP kinases impliquant ERK dans les lignées cellulaires α T3-1 et L β T2 (Levi et al, 1998 ; Grosse et al, 2000b ; Roelle et al, 2003) où ERK régule également l'expression des sous-unités α et β des gonadotropines (Benard et al, 2001). L'entrée du Ca^{2+} extracellulaire dans la cellule et la libération du Ca^{2+} intracellulaire contenu dans le réticulum endoplasmique permet l'activation de la NO Synthase neuronale (NOS-1), responsable de la production de NO et de GMPc favorisant l'activité transcriptionnelle des gènes cibles (Ceccatelli et al, 1993 ; Garrel et al, 1998 ; Lozach et al, 1998).

La voie de l'AMPc est modulée par l'activation de la protéine $G\alpha_i$ (Hawes et al, 1993 ; Limonta et al, 1999) et/ou par la protéine $G\alpha_s$ (Imai et al, 1996b ; Liu et al, 2002). Une partie des mécanismes de cette voie a été mise en évidence au laboratoire (Larivière et al, 2007). L'AMPc produite par l'adénylate cyclase activée par la protéine G stimule à son tour les protéines kinases A (PKA) ainsi que d'autres kinases. Cette voie serait activée par des décharges importantes de GnRH et plus tardivement par rapport aux autres voies (Larivière et al, 2007 ; pour revue Naor et al, 2009).

En résumé, toutes ces voies de transduction du signal vont induire la transcription des gènes de la LH β , de la FSH β , de CGA, du GnRHR (Lerrant et al, 1995) mais également certaines protéines des voies de signalisation telles que des PKAs, NOS-1 (Garrel et al, 1995 et 1998) et des PKCs (Harris et al, 1997). Plus de 200 gènes sont ainsi régulés par le système GnRH/GnRHR (Kakar et al, 2003, pour revue 2004).

L'activation de ces gènes codant diverses protéines, entre autres les protéines des voies de signalisation, et l'absence de domaine C-terminal chez les Mammifères permettent de conclure que, malgré le petit nombre de récepteurs présents à la surface des cellules gonadotropes, le signal est hautement amplifié. L'internalisation du GnRHR mammalien est quantitativement plus faible que celle des récepteurs classiques de la même famille. Elle a été néanmoins mise en évidence par une approche de localisation par immunofluorescence (Pawson et al, 2008 ; Finch et al, 2009).

Le rythme de la sécrétion de la GnRH, la fréquence des pulses, sa durée d'action, mais également les hormones stéroïdes qui agissent par rétrocontrôle sont des régulateurs de l'activité du récepteur (Xia et al, 1992 ; pour revue Counis et al, 2009 ; Kumbrink et al, 2009). Ainsi, une fréquence lente des pulses de GnRH favorise la transcription du gène de la sous-

unité β de la FSH. A l'inverse, des pulses réguliers rapides, par exemple toutes les 30 minutes, favorisent la transcription des sous-unités α et β de la LH (Dalkin et al, 1989 ; Burger et al, 2002). Une stimulation continue de GnRH provoque l'arrêt de la transcription des gènes des sous-unités β de la LH et de la FSH et du *Gnrhr* mais entraîne une accumulation de la sous-unité α (Lahlou et al, 1987 ; Lalloz et al, 1988 ; Rodin et al, 1988 ; Lerrant et al, 1995).

1.3.3 La mise en évidence de la présence du GnRHR extra-hypophysaire

1.3.3.1 Le système GnRH/GnRHR dans les tissus sains et tumoraux.

Plusieurs études, dont certaines réalisées au laboratoire, démontrent la présence du GnRHR dans plusieurs sites extra-hypophysaires. Ces récepteurs, souvent identifiés par liaison d'un agoniste radio-marqué, présentent des caractéristiques similaires à celles du récepteur hypophysaire et ont été identifiés dans une grande variété de tumeurs sensibles aux hormones, comme les tumeurs ovariennes, de l'endomètre et du sein, de la prostate et des testicules. Ces récepteurs ont également été identifiés sur des cellules issues de tissus sains tels les ovaires, le placenta ou les surrénales (Eidne et al, 1985-1987 ; Miller et al, 1985 ; Bramley et al, 1986 ; Emons et al, 1989 ; Qayum et al, 1990 ; Vincze et al, 1991). Les méthodes d'investigation évoluant, les recherches s'appuient désormais sur la PCR quantitative en temps réel, sur l'hybridation *in situ* et sur les techniques de Northern et Southern blot. Il y a également quelques exemples d'approches par immunocytochimie mais celles-ci reposent sur des anticorps anti-GnRHR dont la spécificité demande à être confirmée (Albertson et al, 2008a). C'est d'ailleurs l'échec dans l'obtention d'anticorps anti-GnRHR efficaces et spécifiques qui a, en partie, conduit le laboratoire à créer le modèle transgénique comportant le gène rapporteur phosphatase alcaline placentaire humain sous contrôle du promoteur du *Gnrhr*. Ainsi, cette lignée de souris transgénique s'est révélée être un modèle puissant d'investigation fonctionnelle, permettant de suggérer la présence du GnRHR dès E13.5 de développement embryonnaire dans l'hypophyse, d'affiner sa localisation et son rôle dans l'hippocampe et dans plusieurs structures limbiques, ainsi que dans la rétine et la glande pinéale. Ce modèle a permis aussi d'établir la cinétique d'apparition du récepteur dans les structures extra-hypophysaires (Granger et al, 2004 ; Schang et al 2011a - 2011b - 2012).

1.4 Le gène du récepteur de la GnRH

1.4.1 Structure générale du gène humain et des rongeurs

Le gène du récepteur de la GnRH est situé sur le chromosome 4q21.2 chez l'Homme, sur le chromosome 5 chez la souris et sur le chromosome 14 chez le rat (Kaiser et al, 1994 ; Campion et al, 1996). Il est formé de trois exons et deux introns et s'étend sur 18,9 kb chez l'Homme et 22 kb chez la souris. Ce qui le distingue des autres gènes de la famille des GPCR à laquelle il appartient, c'est la présence des séquences introniques dans la séquence codant le 4^{ème} domaine transmembranaire et la 3^{ème} boucle intracellulaire (Fan et al, 1994). C'est une caractéristique du GnRHR mammalien. Chez le rat, le gène est localisé sur le bras long du chromosome 14q21. Le transcrit fait 2,6 kb et code pour une protéine de 327 acides aminés (Moumni et al, 1994).

1.4.2 Les promoteurs du *Gnrhr*

Le promoteur du *Gnrhr* a été isolé chez le rat, la souris, l'Homme et le mouton (Albarracin et al, 1994 ; Fan et al, 1995 ; Campion et al, 1996 ; Reinhart et al, 1997 ; Kakar et al, 1997 ; Pincas et al, 1998). Une partie du promoteur du rat présente 80% d'identité avec une partie du promoteur de souris et 55% avec une partie de celui de l'Homme (Pincas et al, 1998) (pour revue Hapgood et al, 2005).

Le promoteur de souris (Albarracin et al, 1994 ; Clay et al, 1995) isolé dans les cellules α T3-1 possède plusieurs sites d'initiation de la transcription à -62 pb, à -90 pb et à -200 pb de l'ATG ; il est dépourvu de boîte TATA et CAAT, séquences consensus permettant de positionner précisément le site d'initiation de la transcription. Un site de liaison pour l'Activator Protein 1 (AP1) se trouve à -336 pb, un site de liaison pour SF1 à -243 pb et un site correspondant à une séquence activant le *Gnrhr* (GRAS) à -391 pb (Duval et al, 1997b). Les expériences réalisées sur les cellules α T3-1 par les techniques de biologie moléculaire classiques ont permis de mettre en évidence un domaine supportant la réponse à PITX1 (-354/-330). Cette séquence contient plusieurs sites de liaison à faible affinité. Sur ce même domaine se fixent également des facteurs à homéodomaine comme OCT1 (-352/-349) et LHX3 (-360/-357) (Jeong et al, 2004 ; McGillivray et al, 2005).

1.4.3 ISL1 et LHX3, des protéines LIM-HD essentielles à l'expression du *Gnrhr*.

Une partie du promoteur de rat de 3254 pb a été isolée au laboratoire par PCR inverse (Pincas et al, 1998). Cinq sites d'initiation de la transcription ont été identifiés en amont de l'ATG ainsi que des séquences *cis*-régulatrices (Pincas et al, 1998). Ces séquences se répartissent sur deux domaines régulateurs : une région active proximale entre -475 pb et -32 pb et une région active distale, située plus en amont entre -1135 pb et -753 pb, dénommée GnSE pour "*Gnrhr* Specific Enhancer". La région active proximale comprend un site de liaison CRE (-110/-103) sur lequel se fixe le facteur de transcription CREB et un site de liaison pour le facteur stéroïdogénique SF1 (-245/-237). Il y a également un site de liaison fonctionnel pour un facteur non identifié dénommé SAP (-252/-246) pour "SF1 Adjacent Protein" et enfin un site de liaison pour le facteur de transcription AP1 (-352/-346) (Activator Protein 1) (Pincas et al, 1998-2001a-2001b ; Granger et al, 2006). La région active distale se décompose en deux éléments fonctionnels indépendants désormais bien caractérisés. L'un de ces deux éléments, situé entre -873 et -852, est activé par l'hétérodimère que forment les deux protéines LIM à homéodomaine (LIM-HD) LHX3 et ISL1 et dénommé pour cette raison P-LIRE pour "Proximal LIM Response Element" (Granger et al, 2006). L'autre élément, situé plus en amont entre -992 et -961, est plus complexe, bi-fonctionnel, possédant à la fois les caractéristiques d'un enhancer et d'un silencer. Une partie de cet élément comprend un site GATA palindromique ATCTGATAA (le palindrome est souligné) qui empiète sur un motif cœur TAAT, indispensable à l'activation par les protéines LIM-HD, LHX3 et ISL1. Ce deuxième élément LIRE, dénommé D-LIRE est activé par les protéines LIM-HD et inhibé par GATA2. La balance entre ces trois facteurs permettrait d'ajuster finement l'expression du récepteur dans les cellules gonadotropes et de l'inhiber dans les cellules non gonadotropes qui n'expriment pas ISL1 (Schang et al, manuscrit en révision).

L'expression des protéines ISL1 et LHX3 est co-localisée avec l'activité du promoteur du *Gnrhr* à E15.5 *in vivo* et également avec l'expression de SF1 (Granger et al, 2006). Dans l'hypophyse antérieure, l'activation transcriptionnelle synergique des promoteurs des gènes de la sous-unité β de la TSH, de PIT-1 et de la prolactine résulte d'interactions directes entre la protéine LIM-HD LHX3 et le domaine POU du facteur hypophysaire PIT-1 (Bach et al, 1995). Les protéines LIM-HD peuvent donc aussi interagir avec des facteurs de transcription

appartenant à d'autres familles. Plusieurs observations suggèrent que l'hétérodimère LHX3-ISL1 pourrait former avec SF1 un complexe transcriptionnel activant le promoteur du *Gnrhr* de façon spécifique à E15.5. (Granger et al, 2006). En revanche, les protéines LIM-HD agiraient indépendamment de SF1 pour induire l'expression du *Gnrhr* à E13.5. A ce stade de développement, SF1 n'est pas détectable dans l'hypophyse (Granger et al, 2004). L'interdépendance fonctionnelle entre les protéines LIM-HD et SF1 s'établirait entre E13.5 et E15.5, assurant la spécification du lignage (Granger et al, 2006).

1.5 ISL1, une protéine LIM à homéodomaine parmi d'autres ?

Le gène ISL1 code une protéine jouant un rôle essentiel durant l'embryogenèse, en particulier dans la mise en place du cœur, du pancréas, des motoneurones de la moelle épinière et du cerveau et dans le maintien des phénotypes différenciés au stade adulte.

ISL1 fut initialement isolée et identifiée sur sa capacité à stimuler l'expression du gène de l'insuline I de rat en interagissant avec l'un des deux domaines de l'enhancer localisé sur le promoteur de ce gène (Karlsson et al, 1990). Très peu de temps après cette découverte, le même groupe démontrait déjà que ISL1, ou tout au moins ses transcrits, étaient détectés non seulement dans les cellules des îlots de Langerhans mais aussi dans les lignées PC12 de phéochromocytome, dans les cellules pancréatiques normales et tumorales, dans les cellules du tube distal du rein, dans l'hypophyse antérieure et dans des neurones du système nerveux central et périphérique (Dong et al, 1991). Nous verrons plus loin comment ces données se sont confirmées, conférant à ISL1 des rôles essentiels dans l'ontogénèse et la différenciation de ces tissus. Actuellement, les données concernant ISL1 font l'objet de 593 références dans PubMed depuis sa caractérisation en 1990 (Query : *Isl1* OR *Isl-1*) ce qui reste assez modeste comparé au système GnRH/GnRHR (35288 références depuis 1969). Chez l'Homme, ISL1 est situé sur le bras long du chromosome 5q11.1 et chez la souris, sur le chromosome 13. Ce gène est très conservé au cours de l'évolution et contient six exons et cinq introns (**Figure 3**). Les ARN précurseurs d'*Isl1* subissent un épissage alternatif au niveau de l'exon 5 dans les cellules pancréatiques engendrant deux isoformes : ISL1 α et ISL1 β (Ando et al, 2003). Le transcrit du gène *Isl1* α comporte 2755 paires de bases et code pour une protéine de 349 acides aminés tandis que le transcrit d'*Isl1* β génère une protéine tronquée de 23 acides aminés à

l'extrémité C-terminale. Dans les lignées cellulaires dérivées d'insulinome, les deux isoformes s'accumulent dans les noyaux mais ISL1 β est préférentiellement exprimée et s'avère plus active qu'ISL1 α . Outre cette régulation par épissage alternatif, ISL1 α est soumise à des phosphorylations sur des résidus Thr et Ser situés sur l'extrémité C terminale de la protéine (Ando et al, 2003).

ISL1 s'exprime dans plusieurs tissus équivalents chez plusieurs espèces. Chez l'embryon de poulet comme chez la souris, ISL1 est exprimée dans les motoneurones de la moelle épinière juste après leur mitose finale et avant l'apparition des caractéristiques phénotypiques différenciées (Ericson et al, 1992 ; Tsuchida et al, 1994). Chez l'embryon du zébrafish, l'expression de cette protéine LIM-HD est initiée dans beaucoup de neurones primaires à la fin de la gastrulation dans le cerveau et la moelle épinière, incluant les motoneurones primaires, et précède beaucoup d'autres marqueurs neuronaux connus (Korzh et al, 1993 ; Inoue et al, 1994). Chez la drosophile, ISL1 est exprimée dans les motoneurones et s'avère requise pour l'extension des axones vers leurs cibles appropriées (Thor et Thomas, 1997).

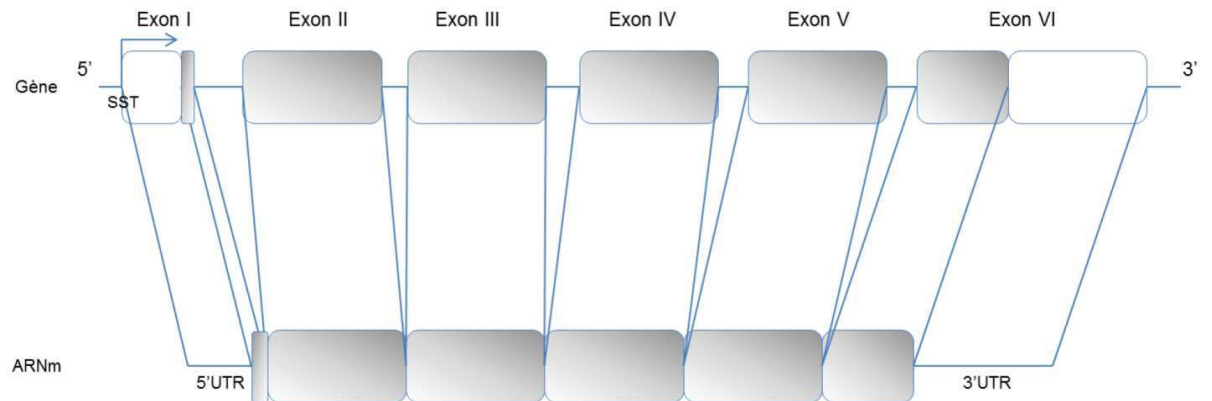


Figure 3
Structure du gène d'ISL1 mammalien

Le gène codant la protéine LIM à homéodomaine ISL1 mammalienne est constitué de 6 exons et de 5 introns. Il existe deux transcrits, ISL1 α et ISL1 β , obtenus par épissage alternatif au niveau de l'exon 5 conduisant à l'élimination de 23 acides aminés dans la partie C-terminale de la protéine ISL1.

L'expression d'ISL1 est détectée dans les neurones des ganglions de la base (Wang et al, 2000), dans les motoneurones spinaux (Ericson et al, 1992 ; Tsuchida et al, 1994 ; Lumdsen et al, 1995 ; Pfaff et al, 1996 ; Thaller et al, 2002-2004), dans la rétine et le pancréas (Kalrsson et al, 1990 ; Thor et al, 1991 ; Dong et al, 1991 ; Ahlgren et al, 1997). ISL1 est un marqueur précoce des cellules progénitrices cardiaques et il est exprimé dans le mésoderme cardiogénique et l'endoderme pharyngé (Xuan et al, 2000 ; Cai et al, 2003 ; SunY et al, 2007). ISL1 est essentiel pour le développement des sous-ensembles de neurones cholinergiques du prosencéphale et du cerveau antérieur, des cellules ganglionnaires, bipolaires et amacrines cholinergiques rétinienne (Galli-Resta et al, 1997 ; Elshatory et al, 2007-2008 ; Pan L et al, 2008) et pour le développement des dents (Mitsiadis et al, 2003). L'expression d'ISL1 est détectée dans l'hypophyse antérieure, la thyroïde, dans le système nerveux central : les noyaux arqués de l'hypothalamus, la glande pinéale, les noyaux réticulaires thalamiques, le tronc cérébral, les neurones du striatum, l'amygdale (Thor et al, 1991 ; Dong et al, 1991 ; Wang et al, 2001). ISL1 est exprimé dans les noyaux cérébraux impliqués dans l'autonomie et le contrôle endocrinien et dans le contrôle du rythme circadien, suggérant un rôle d'ISL1 dans la spécification et la maintenance des propriétés physiologiques neurales et endocrines de différents types cellulaires (Thor et al, 1991).

1.5.1 Les protéines LIM

L'acronyme LIM est dérivé des trois gènes initialement découverts *Lin11*, *Isl1* and *Mec3* (Way and Chalfie, 1988 ; Karlsson et al, 1990) comportant ce domaine protéique riche en histidine et cystéine, composé de deux doigts de zinc en tandem et impliqué essentiellement dans les interactions protéine/protéine. Un grand nombre de protéines possède ce domaine, généralement en plusieurs exemplaires. D'après Zheng et Zhao (2007) on peut regrouper ces protéines en quatre classes distinctes selon leur localisation intracellulaire, leur fonction et les domaines structuraux supplémentaires qu'elles partagent. On distingue les protéines LIM de la classe 1 qui comportent 2 domaines LIM seulement (LIM only ou LMO) ou ces deux domaines associés à un homéodomaine (LIM-HD), domaine d'interaction avec l'ADN, comme LHX3 et ISL1. Toutes ces protéines sont soit des facteurs de transcription (LIM-HD) soit des cofacteurs (LMO) et donc localisées dans le noyau de la cellule. Les trois autres classes de protéines à domaines LIM sont hors du propos de cette thèse et regroupent : les protéines de la classe 2 à domaines LIM seulement (LMO) que l'on distingue des

précédentes par leurs localisations cytoplasmique et nucléaire et qui peuvent comporter deux domaines LIM ou plus. Les protéines de la classe 3 dont le domaine LIM est associé à un autre domaine d'interaction protéine/protéine comme les domaines PDZ (pour PSD-95, discs-large et ZO-1), LD (leucine-aspartate repeat) et ATD (actin-target domain). Enfin les protéines de la classe 4 qui, outre ces caractéristiques, présentent un motif catalytique comme les LIM-kinases. ISL1, comme nous l'avons déjà précisé, appartient à la classe 1, et au sein de cette classe, aux protéines LIM à homéodomaine qui regroupe seulement 12 protéines connues, 12 protéines qui jouent toutes un rôle décisif dans plusieurs processus développementaux (**Figure 4**).

1.5.2 Les protéines LIM à homéodomaine (LIM-HD)

Chez les Vertébrés et les Invertébrés, elles sont considérées comme des régulateurs transcriptionnels qui, en coopération avec d'autres facteurs de transcription, jouent un rôle essentiel dans le développement embryonnaire en régulant l'expression de gènes nécessaires à la mise en place des tissus, des organes et l'établissement de l'identité cellulaire durant l'embryogenèse (pour revue Sanchez-Garcia et Rabbitts, 1994 ; Dawid et al, 1995 ; Curtiss et Heilig, 1998).

Les protéines LIM-HD (**Figure 5**) sont des facteurs de transcription très conservés et donc soumis à une pression de sélection très forte comme nous l'illustrerons un peu plus loin avec ISL1. L'homéo domaine qui les distingue des autres protéines LIM est une structure en hélice-tour-hélice (helix-turn-helix ou HTH) présentant une forte affinité de liaison pour les séquences d'ADN possédant en leur cœur un motif TAAT. C'est cette capacité de liaison à l'ADN et leur propriété d'interagir avec d'autres protéines qui confèrent à ces protéines des fonctions déterminantes dans le développement précoce ou tardif chez l'embryon ainsi que dans le maintien du phénotype différencié chez l'animal adulte

Ainsi l'invalidation de *Lhx1* se traduit par un phénotype anencéphalique (Shawlot et Behringer, 1995), auquel s'ajoute l'absence de rein et de gonade. Chez la femelle invalidée, les oviductes et l'utérus sont également absents. Chez les animaux invalidés pour *Lhx2*, le développement des yeux s'arrête au stade de la vésicule optique, les précurseurs neuronaux prolifèrent peu avec pour conséquence un cortex cérébral plus petit et l'érythropoïèse est incomplète, engendrant une anémie sévère et létale (Porter et al, 1997). La conservation

fonctionnelle de *Lhx2* est particulièrement spectaculaire puisque capable de suppléer à *Apterous*, le gène orthologue chez la drosophile (Rincón-Limas et al, 1999). Les souris homozygotes pour la délétion de *Lhx3* meurent avant ou peu après la naissance avec une hypophyse atrophiée et aucun lignage cellulaire antéhypophysaire ne se différencie à l'exception des cellules corticotropes (Sheng et al, 1996). De plus le développement des neurones moteurs de la moelle épinière est profondément affecté. Un phénotype encore plus sévère affecte les doubles mutants LHX3/LHX4 puisque dans ce cas, la future hypophyse ou poche de Rathke se forme mais ne prolifère pas et finit par disparaître. (Sheng et al, 1997). L'invalidation de *Lhx5* affecte profondément le développement des structures hippocampales aboutissant le plus souvent à la mort post-natale des souris invalidées (Zhao et al, 1999). Les animaux survivants présentent de graves déficits d'apprentissage et de mémorisation. L'invalidation de *Lhx8* (dénommé également *Lhx7*) se traduit par une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la morphogenèse des dents, notamment *Lhx6*, et par une fente complète du palais secondaire qui est généralement létale après la naissance (Zhao et al, 1999). Ces mutants présentent également des altérations du développement des neurones cholinergiques du télencéphale (Zhao et al, 2003). D'autres exemples de l'importance des protéines LIM-HD dans le développement des Mammifères sont décrits et résumés par le groupe de Simon J Rhodes (Hunter et Rhodes, 2005). Sont également récapitulées dans cette revue, les impacts de certaines mutations de ces protéines dans les pathologies humaines.

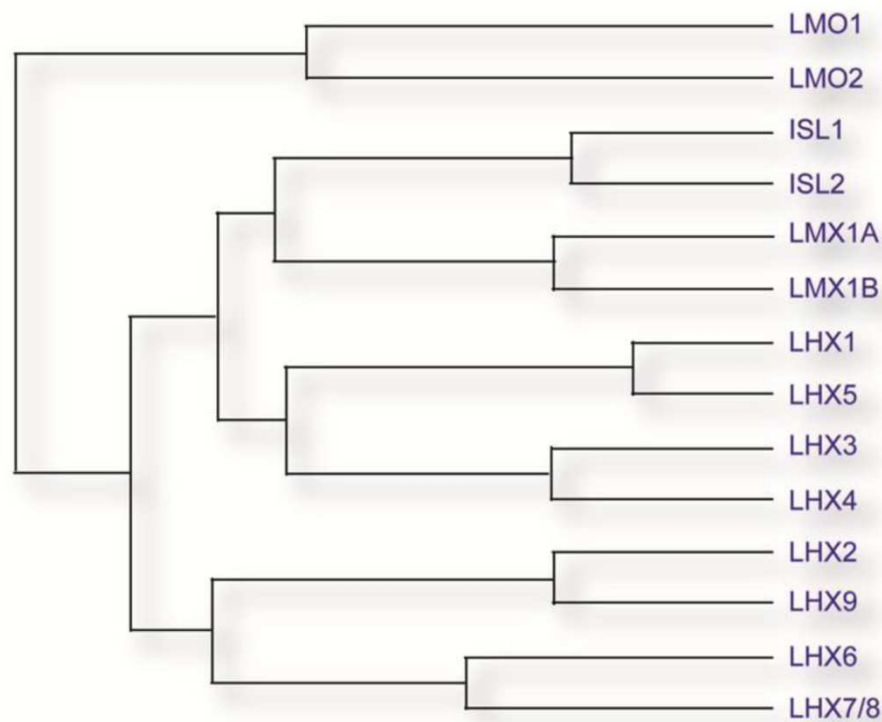


Figure 4
Cladogramme des facteurs LIM chez la souris

Le cladogramme des facteurs LIM murins a été obtenu à partir du programme ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Les séquences protéiques des protéines LIM-HD des familles ISL et LHX et des protéines LIM-only (LMO) de souris ont été comparées pour réaliser ce cladogramme. Les protéines LIM-HD sont au nombre de 12 et sont organisées en 6 paires de gènes paralogues. Une paire de paralogues de protéine LIM-only est aussi présentée dans ce cladogramme. La protéine ISL1 présente une forte homologie avec ISL2 et la protéine LIM-HD LHX3 avec LHX4. Les protéines dont les séquences présentent une certaine homologie exercent généralement des rôles redondants, comme ISL1, ISL2, LHX3 et LHX4

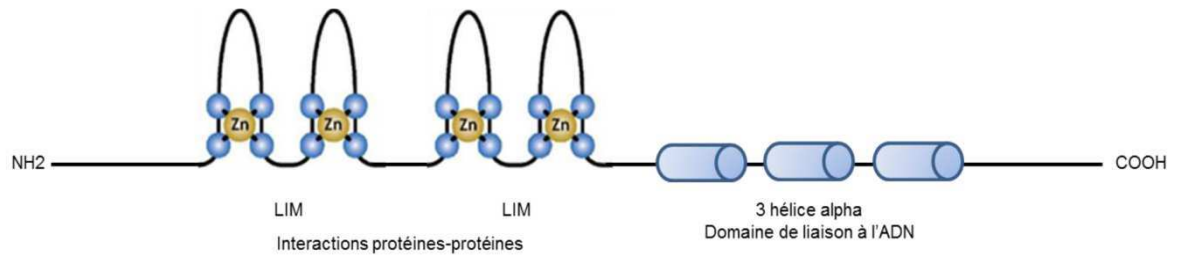


Figure 5
Facteurs LIM à homéodomaine (ISL1 et LHX3)

Les protéines LIM à homéodomaines sont composées de deux domaines LIM localisés dans l'extrémité N-terminale et d'un homéodomaine situé dans la partie C-terminale. Les deux domaines LIM sont formés d'un tandem de structures en doigt de zinc riches en cystéines et en histidines. Ces domaines permettent les interactions protéines/protéines. L'homéodomaine est formé de trois hélices alpha lui conférant la propriété de se lier à l'ADN sur des motifs consensus spécifiques des gènes cibles

1.5.3 ISL1 est impliquée dans plusieurs processus développementaux

Parmi toutes les protéines LIM-HD et d'autres facteurs de transcription largement exprimés dans divers organismes comme FOS, JUN ou CREB, ISL1 est une protéine extraordinairement conservée, la seule parmi celles testées arborant 100% de conservation chez des Mammifères tels que l'Homme, le chien, la vache, la souris et le rat. La protéine des Mammifères affiche également 98% d'identité avec celle de poissons téléostéens. Cette remarquable conservation implique une pression de sélection tout aussi forte, à la mesure des rôles que joue ce facteur dans de nombreux processus développementaux et des fonctions qu'il occupe chez l'animal adulte dans le maintien des caractères différenciés. Avant d'aborder ce sujet, il est nécessaire de décrire les mécanismes d'interactions entre facteurs LIM-HD, LMO et autres adaptateurs moléculaires formant une combinatoire de facteurs regroupant plusieurs protéines LIM-HD et LMO, désignée sous le terme de "code LIM".

1.5.3.1 *Les interactions moléculaires à la base du "code LIM"*

Plusieurs facteurs capables d'interagir avec les protéines LIM-HD sont désormais connus. Il s'agit de facteurs de transcription ou de co-facteurs particuliers agissant comme des adaptateurs assurant une interface moléculaire nécessaire à l'interaction de différentes protéines LIM-HD ou de protéines LMO et LIM-HD.

Le facteur SLB (selective LIM Binding Protein) interagirait avec LHX3 ou LHX4 et s'exprimerait spécifiquement dans l'hypophyse et les testicules (Howard et Maurer, 2000). Des travaux plus récents ont démontré, par invalidation génique, que le gène *Iftp172* (Intraflagellar transport protein 172) codant pour SLB joue en fait un rôle majeur dans le développement du cerveau comme composant essentiel de la morphogenèse des cils cellulaires et de leur signalisation (Gorivodsky et al, 2008). Sa fonction d'adaptateur moléculaire reste donc à confirmer.

Par contre, les rôles des Cofacteurs LIM (CLIM 1 et 2) homologues, caractérisés par leur capacité à interagir avec toutes les protéines LIM-HD, ont fait l'objet d'études approfondies qui ont permis de certifier leur fonction d'adaptateur moléculaire. Ainsi, CLIM2, NLI (Nuclear LIM Interactor 1) ou LDB1 (LIM Domain-Binding Protein 1) possède une séquence d'une trentaine de résidus baptisée LID pour LIM Interaction Domain. Ce domaine

est capable d'interagir avec les domaines LIM des protéines LIM-HD et LMO (Sugihara et al, 1998 ; Thaler et al, 2002 ; Ostendorff et al, 2006 ; Bhati et al, 2008 ; pour revue Matthews et al, 2008 ; Gadd et al, 2011). Des études de mutagénèses dirigées, de cristallographie aux rayons X, de RMN et des approches bio-informatiques ont permis d'identifier les domaines de liaisons entre LHX3 et LDB1 : LHX3 *via* ces deux domaines LIM (Lhx3_{LIM1+2}) se lie à la séquence LID de LDB1 (Ldb1_{LID}). Le domaine LIM1 de LHX3₍₂₈₋₈₉₎ se lie à onze résidus du domaine LID de LDB1₍₃₁₆₋₃₂₇₎ et le domaine LIM2 de LHX3₍₉₁₋₁₅₁₎ se lie à dix autres résidus du domaine LID de LDB1₍₃₀₁₋₃₁₁₎.

De plus LDB1 possède à son extrémité N-terminale un domaine d'auto-association (Self Association domain - SA) lui permettant de réunir au sein d'un même complexe au moins deux protéines LIM-HD ou LMO différentes.

Il est également important de souligner qu'ISL1 et ISL2 possède des domaines d'interactions spécifiques avec LHX3, LHX4 et LDB1. ISL1 est ainsi capable d'établir une liaison avec LDB1_{LID} et avec LHX3 : dans la région N-terminale d'ISL1, les résidus 262 à 273 (formant le domaine ISL1_{LDB}) se lient avec les résidus du domaine LIM2 de LHX3 et les domaines LIM1 et LIM2 d'ISL1 se lient à LDB1_{LID} (Thaler et al, 2002 ; Bhati et al, 2008 ; pour revue Matthews et al, 2008 ; Gadd et al, 2011). Le complexe ternaire LHX3/ISL1/LDB1 ainsi formé est renforcé par liaison des homéodomaines des protéines ISL1 et LHX3 à la séquence promotrice des gènes cibles (**Figure 6**) (Thaler et al, 1999-2002 ; Lee et Pfaff, 2003). LHX4 et ISL2 sont également capables d'interagir pour former des complexes transcriptionnels (Gadd et al, 2011). ISL2 possède un domaine similaire à ISL1_{LDB} pouvant se lier à LHX3 et LHX4. ISL1_{LDB} peut également se lier à LHX4. En revanche, les études de cristallographie aux rayons X et de mutagénèses dirigées ont révélé que, malgré la similitude des complexes LHX3/ISL1 et LHX4/ISL2, la nature des liaisons entre ces protéines LIM-HD confère à ces deux complexes des fonctions biologiques différentes (Gadd et al, 2011).

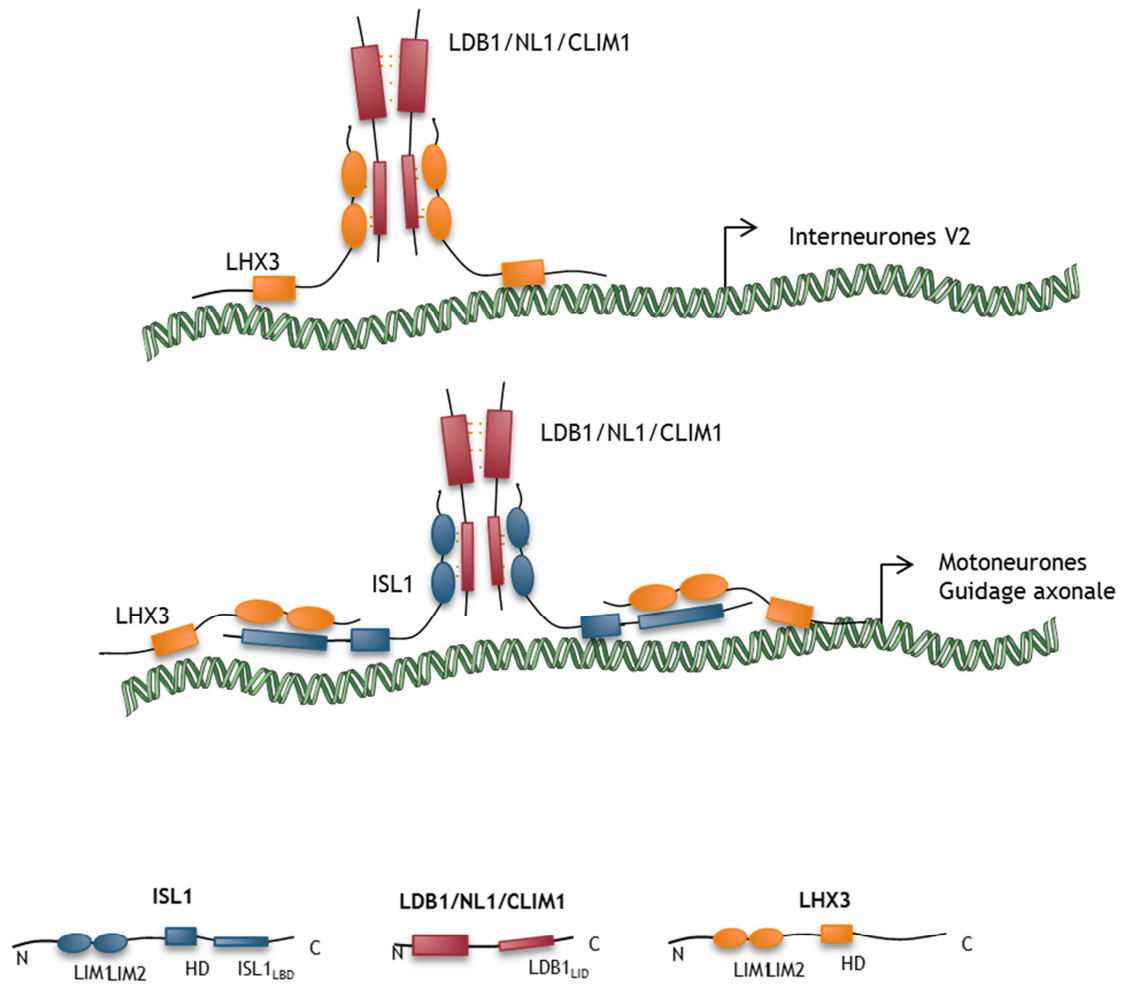


Figure 6
Le code LIM transcriptionnel dans la moelle épinière

A : Schéma du complexe binaire LHX3/LDB1 mis en évidence dans les interneurons V2 en développement. Deux complexes binaires se lient entre eux pour former un tétramère

B : Schéma du complexe ternaire LHX3/ISL1/LDB1 formé dans les motoneurons post-mitotiques en développement. Ce complexe ternaire est couplé à un autre complexe ternaire pour former un hexamère.

1.5.3.2 *Les divers rôles d'ISL1 dans le développement chez les Mammifères*

Détermination de l'identité des neurones moteurs de la moelle épinière

Le système nerveux est source d'une considérable diversité cellulaire et le déchiffrement des mécanismes impliqués dans l'émergence et la différenciation de ces types cellulaires constitue un véritable défi pour les développementalistes. La destinée neuronale *versus* non neuronale (par exemple gliale) des cellules progénitrices est assurée par des répresseurs transcriptionnels qui bloquent les programmes géniques non-neuronaux et par des activateurs transcriptionnels pro-neuronaux. Dans la moelle épinière, ce sont des molécules signalisatrices telles sonic hedgehog et des facteurs de transcription comme OLIG2, PAX6, NKX6 qui stimulent l'expression de facteurs de type basic Helix-Loop-Helix comme HB9 qui eux-mêmes assurent la destinée neuronale. Selon leurs futures fonctions, les neurones post-mitotiques vont devoir alors migrer pour se localiser à des endroits précis dans la moelle épinière et projeter leurs extensions neuritiques vers des cibles définies. Ainsi les neurones moteurs somatiques se répartissent sur l'ensemble de l'axe rostro-caudal dans la corne ventrale de la moelle épinière et innervent les muscles squelettiques pour assurer les mouvements volontaires de l'animal. Les neurones moteurs viscéraux se situent plutôt dans la partie intermédiaire de la moelle, innervent les neurones sympathiques et assurent le contrôle autonome de cibles viscérales (rythme cardiaque, respiratoire, digestion...). Les protéines LIM-HD déterminent la spécification de l'identité de ces sous-classes de neurones moteurs dans la moelle épinière *via* l'utilisation du code LIM. Chez la souris, à E9.5, les neurones moteurs post-mitotiques expriment à la fois ISL1 et ISL2 avant leur diversification en neurones somatiques et viscéraux. Aux étapes plus tardives du développement, seuls les neurones moteurs somatiques continuent d'exprimer ISL1 et ISL2. L'expression d'ISL2 est progressivement réprimée dans les neurones moteurs viscéraux où seule persiste l'expression d'ISL1. Néanmoins, cette expression conjointe d'ISL1 et ISL2 est absolument requise dans les stades précoces pour permettre la différenciation des deux types de neurones, l'invalidation d'*Isl2* se traduisant notamment par des localisations aberrantes des neurones viscéraux et des défauts dans les projections axonales périphériques (Thaler et al, 2004). L'intervention du code LIM est encore plus complexe et subtile dans la spécification des interneurons V2 et des motoneurons (Thaler et al, 2002). Dans les étapes précoces, les neurones postmitotiques expriment LHX3 et LHX4. Les neurones destinés à devenir des motoneurons expriment

aussi ISL1. Les interneurons V2 se différencient *via* la formation d'un complexe transcriptionnel tétramérique impliquant deux protéines NLI (LDB1) interagissant *via* leur domaine d'auto-association et deux protéines LHX3, chacune d'entre elles liant, *via* ses domaines LIM, le domaine LBD (LIM binding domain) de chaque protéine NLI. Dans les motoneurons, le complexe transcriptionnel est différent. Il est hexamérique comprenant deux protéines ISL1 supplémentaires qui prennent la place de LHX3 dans l'interaction avec NLI. Les protéines ISL1, par le biais de leur domaine d'interaction spécifique avec LHX3, lient chacune une protéine LHX3 (**Figure 6**). Ces deux exemples illustrent l'importance des protéines LIM-HD et de l'adaptateur NLI (LDB1) dans l'établissement de l'identité des neurones moteurs et des interneurons dans la moelle épinière. Ces travaux ont fait l'objet de nombreuses publications, impliquant non seulement ISL1, ISL2, LHX3, NLI, mais aussi LHX1 et LHX4 (Shirasaki et Pfaff, 2002). Finalement, ce "code LIM" serait aussi un synchronisateur entre neurogenèse (destinée neuronale *versus* non-neuronale) et spécification de l'identité des sous-types neuronaux (quel type de neurone ?). Ainsi l'enhancer du gène *Hb9* impliqué dans la neurogenèse est-il activé dans les neurones moteurs par une combinatoire transcriptionnelle impliquant l'hexamère (LHX3/ISL1/NLI) x 2 et les facteurs de transcription NEUROM et NGN2 agissant sur des motifs situés à proximité les uns des autres sur l'enhancer d'*Hb9* (Lee et al, 2003)

L'interaction LHX3/ISL1 n'est pas restreinte aux interneurons et motoneurons. Ces deux protéines LIM-HD interagissent aussi dans les cellules hypophysaires pour réguler l'expression du *Gnrhr* (Granger et al, 2006) et le complexe ternaire LHX3/ISL1/LDB1 pourrait reconnaître des motifs au sein du promoteur du gène *FSHβ* favorisant ainsi sa transcription (West et al, 2004).

Développement du muscle cardiaque

ISL1 est un marqueur d'une partie des cellules progénitrices cardiaques (Cai et al, 2003), en l'occurrence, les progéniteurs cardiaques du second champ cardiaque (SHF) qui donnent naissance au ventricule droit, aux voies efférentes et aux oreillettes droites et gauches du cœur (Buckingham et al, 2005 ; Black et al, 2007). Ce second champ cardiaque est défini par l'expression de la protéine ISL1 et le transcrit du gène *Isl1* est détecté au stade de la croissance cardiaque (Cai et al, 2003). Lors de la morphogénèse cardiaque chez les embryons

de souris, les cellules exprimant ISL1 sont présentes dans le mésoderme pharyngé et splanchnique et dans l'endoderme de l'intestin antérieur. L'inactivation d'*Isl1* a pour conséquence la mort de l'embryon à E9.5 et les souris *Isl1*^{-/-} présentent des défauts de développement cardiaque, incluant des défauts de morphogénèse (Cai et al, 2003 ; Kang et al, 2009). ISL1 contribue ainsi à la mise en place du ventricule droit, d'une partie de l'atrium et des muscles striés de la tête et du cou (Cai et al, 2003 ; Ma et al, 2008 ; Nathan et al, 2008). Les cellules progénitrices cardiaques exprimant ISL1 sont multipotentes et donnent naissance à différents lignages cardiaques dont les cardiomyocytes, les cellules endothéliales, les cellules des muscles lisses et contribuent à la formation du pool pro-épicardique durant la morphogénèse du cœur (Langwihz et al, 2005 ; Moretti et al, 2006 ; Zhou et al, 2008 ; Kang et al, 2009). La recherche de séquences non codantes conservées au locus du gène *Isl1* de souris ont permis de mettre en évidence des séquences consensus pour les facteurs de transcription forkhead. En accord avec ces données, le gène *Isl1* s'avère une cible directe des facteurs de transcription forkhead dans le second champ cardiaque (Kang et al, 2009).

Développement du pancréas

La protéine ISL1 a été isolée initialement dans les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Son expression est également détectée dans les cellules α où elle régule le gène du glucagon (Wang et Drucker, 1995 ; Ahlgren et al, 1997), dans les cellules γ où elle régule le gène de la somatostatine (Léonard et al, 1992) et dans les cellules δ où elle régule le gène de l'aniline (Wang et Drucker, 1996) en se liant sur des séquences consensus riches en AT. Les souris *Isl1*^{-/-} montrent une perte complète des cellules des îlots endocrines et du mésenchyme pancréatique dorsal suggérant qu'ISL1 est impliqué dans la spécification des cellules pancréatiques (Ahlgren et al, 1997). Des mutations non-sens hétérozygotes du gène *Isl1* (Q310X) ont été observées chez deux patients souffrant de diabète de type II (Shimomura et al, 2000). Cette mutation engendre une protéine tronquée ISL1-310X déletée de 40 acides aminés au niveau de l'extrémité C-terminale. Les études portant sur les effets de la surexpression du gène *Isl1* chez des souris transgéniques (Muller et al, 2003) et les études sur le diabète chez l'Homme (Kappen et al, 2009) suggèrent que la protéine ISL1 pourrait être impliquée dans la réponse embryonnaire au diabète maternel. Chez la femme diabétique enceinte, les défauts de croissance du bébé à la naissance sont hautement associés avec un diabète maternel durant la grossesse, constituant un phénotype d'embryopathie diabétique

(Goto et Goldman, 1994 ; Muller et al, 2003 ; Kappen et al, 2009). L'exposition du fœtus au diabète de la mère pourrait conduire à une dérégulation de la protéine ISL1 durant le développement embryonnaire, suggérant que le promoteur du gène *Isl1* pourrait contenir des séquences régulatrices sensibles au statut métabolique et activées dans les tissus spécifiquement affectés par l'embryopathie diabétique (Muller et al, 2003 ; Kappen et al, 2009).

Développement et différenciation cellulaire de la rétine

La rétine est composée de 7 types cellulaires majeurs : les cellules ganglionnaires formant la couche la plus externe qui *via* leur prolongements axoniques forment le nerf optique, les cellules amacrines, les cellules bipolaires, les cellules horizontales, les cellules de Muller (gliales), les neurones interplexiformes et les photorécepteurs, de type cône et bâtonnet. L'invalidation générale d'*Isl1* chez la souris conduit à la mort prématurée des embryons peu avant E9.5 donc avant la neurogénèse rétinienne qui s'effectue plus tardivement (Pfaff et al, 1996). Pour déterminer le rôle d'*Isl1* dans la neurogénèse rétinienne, l'invalidation ciblée d'*Isl1* dans la rétine a été réalisée par recombinaison homologe. La CRE recombinase utilisée, placée sous le contrôle du promoteur de *Six3*, a entraîné l'ablation d'*Isl1* dans la rétine à E9.5. Ceci s'est traduit par une réduction significative des cellules ganglionnaires, des cellules bipolaires et des cellules amacrines cholinergiques et un affaiblissement visuel marqué. Les déficits des fonctions rétiniennes et visuelles corrélaient avec la perte des cellules spécifiques (Elshatory et al, 2007). La présence d'ISL1 dans les cellules bipolaires et amacrines cholinergiques leur confère une capacité de développement autonome (Elshatory et al, 2007). En revanche, ISL1 n'est pas responsable de la spécification des cellules bipolaires mais requise dans la différenciation de ces cellules en neurones bipolaires ON ou OFF. Chez l'adulte, l'expression d'*Isl1* se maintient dans les cellules ganglionnaires et les cellules amacrines cholinergiques mais se restreint aux cellules bipolaires ON seulement (Elshatory et al, 2007).

De façon intéressante, l'expression d'ISL1 devient restreinte aux interneurones cholinergiques dans le cerveau antérieur suggérant un rôle important d'ISL1 dans le développement à la fois des neurones cholinergiques de la rétine et du cerveau antérieur (Wang et Liu, 2001 ; Elshatory et al, 2008).

Développement embryonnaire de l'hypophyse

Les cellules glandulaires de l'adénohypophyse dérivent de l'ectoderme oral et la neurohypophyse est un diverticule du diencéphale ventral d'origine neuroectodermique. Le profil primaire de l'hypophyse antérieure est dirigé par un complexe morphogénétique composé de signaux provenant du diencéphale ventral ou *infundibulum*, de l'ectoderme oral, et du mésenchyme ventral juxtahypophysaire. Ils sont essentiels à l'ontogénèse précoce de la Poche de Rathke, future hypophyse, et dans les processus qui organisent la destinée spatio-temporelle des différents types cellulaires endocriniens qui, chez l'adulte, composent l'hypophyse antérieure. L'ontogénèse hypophysaire constitue à ce titre un modèle de développement où la prolifération initiale des cellules progénitrices et leur détermination sont contrôlées directement par plusieurs signaux inductifs extrinsèques et intrinsèques qui agissent à faible distance et de façon complémentaire.

Chez la souris, principal modèle d'étude, la morphogenèse de l'hypophyse débute à E7 avec la formation des territoires présomptifs de l'hypophyse et de l'hypothalamus au niveau de la partie la plus antérieure de la ligne médiane de l'embryon. A E8.5, l'ectoderme oral s'invagine en direction du diencéphale pour former la Poche de Rathke en même temps que le diencéphale ventral lui-même forme un repli qui bourgeonne vers l'ectoderme oral. Ce contact est nécessaire à la détermination des types cellulaires hypophysaires, mettant en avant le rôle primordial de l'*infundibulum* (pour revue Dasen et Rosenfeld, 1999-2001 ; pour revue Scully et Rosenfeld, 2002 ; pour revue Zhu et al, 2007a/b). Entre E10.5 et E12, la Poche de Rathke continue à proliférer, se referme et se sépare de l'ectoderme oral. Entre E12.5 et E15.5, les cellules progénitrices sécrétant les hormones hypophysaires prolifèrent au niveau ventral de la poche pour constituer ce qui formera le lobe antérieur.

Ces phases initiales de la morphogenèse hypophysaire résultent de mécanismes moléculaires impliquant en premier lieu l'intervention de signaux extrinsèques en provenance de l'*infundibulum* et du mésenchyme ventral juxtahypophysaire. BMP4 est détectée à partir d'E8 au niveau du diencéphale ventral et de l'*infundibulum* quand le contact s'établit avec la poche de Rathke à E8.5-E9. L'expression transitoire de BMP4 s'établit suivant un gradient dorso-ventral et induit l'expression d'ISL1. A E9.5, toutes les cellules de la poche de Rathke expriment ISL1. Entre E10-E11.5, l'expression d'ISL1 est graduellement réduite dans les

cellules de la poche de Rathke localisées au plus près de l'*infundibulum* par le biais d'un nouveau gradient dorso-ventral de molécules signalisatrices de type FGF (Fibroblast Growth Factor 8/10/18). L'expression transitoire de FGF induit l'expression de LHX3 à E9.5 préférentiellement dans la partie dorsale de l'hypophyse. Shh (Sonic Hedgehog), une autre molécule signalisatrice extrinsèque est nécessaire à la mise en place de l'hypophyse. L'expression de Shh est détectée à partir du stade E8 le long de l'ectoderme oral excepté au niveau de l'invagination de la poche de Rathke. Après fermeture de la poche de Rathke et de sa séparation de l'ectoderme oral, l'expression de BMP2, détectée dans le mésenchyme ventral juxtahypophysaire, maintient l'expression d'ISL1 dans la partie ventrale de l'hypophyse, région où se développent les futures cellules gonadotropes et thyroïdotropes. A E12.5, son expression persiste au niveau dorsal de la poche de Rathke et s'affaiblit graduellement au niveau ventral (Takuma et al, 1998 ; Treier et al, 1998 ; Ericson et al, 1998 ; pour revue Scully et Rosenfeld, 2002 ; pour revue Zhu et al, 2007a/b).

L'expression d'ISL1 persiste au niveau ventral dans la poche de Rathke. Le gène *Cga* est exprimé conjointement avec ISL1 dans les cellules progénitrices hypophysaires à E11.5. Certaines de ces cellules, potentiellement thyroïdotropes, commencent à exprimer à E12.5 la *Tshb* tandis que d'autres, potentiellement gonadotropes, expriment à E13.5 le *Gnrhr* (Takuma et al, 1998 ; Treier et al, 1998 ; Ericson et al, 1998 ; pour revue Scully et Rosenfeld, 2002 ; Zhao et al, 2006 ; pour revue Zhu et al, 2007a/b). Toute une cascade de facteurs de transcription s'expriment alors de manière autonome, certains transitoirement comme PROP1, d'autres définitivement comme SF1, marqueur du lignage gonadotrope, TPIT, marqueur du lignage corticotrope, et PIT1, marqueur des lignages lactotrope, somatotrope et thyroïdotrope.

Autres fonctions d'ISL1

Chez les rongeurs et les poissons embryonnaires et adultes, ISL1 et le récepteur des œstrogènes (ER) sont exprimés et co-localisent dans certaines régions du système nerveux central (Gay et al, 2000 ; Davis et al, 2004). Les protéines ER et ISL1 sont exprimées dans l'aire préoptique, le noyau ventromédian, les noyaux arqués de l'hypothalamus et agissent comme des facteurs de transcription en régulant l'expression de plusieurs gènes (Thor et al, 1991 ; Gay et al, 2000 ; Klinge et al, 2001). Les analyses moléculaires et les études d'immunomarquages montrent une interaction directe *in vivo* et *in vitro* entre ISL1 et ER

médiée par l'œstradiol. ISL1 empêche la dimérisation d'ER en solution et inhibe *via* ses domaines LIM les activations transcriptionnelles induites par ER. Enfin les études suggèrent qu'ISL1 est exprimée dans les cellules distribuées le long des noyaux hypothalamiques mais le degré de co-localisation entre ISL1 et ER diffère selon les noyaux et le stade de développement (Gay et al, 2000 ; Davis et al, 2004).

La protéine ISL1 est non seulement impliquée dans la différenciation du lignage gonadotrope mais elle joue également chez l'adulte un rôle essentiel dans la physiologie hypophysaire (Sheng et al, 1997 ; Liu et al, 2005a/b). Elle est ainsi impliquée dans la régulation de la production des hormones gonadotropes LH et FSH en augmentant la transcription des gènes *LHβ* et *FSHβ* et semble médier les effets de la leptine sur la synthèse des gonadotropines (Wu et al, 2010b). La leptine, une hormone synthétisée et sécrétée dans la circulation sanguine par les adipocytes est essentielle à la fonction de reproduction, la mutation de son gène se traduisant par l'infertilité. Inversement, l'administration de leptine dans le cadre de traitement contre l'obésité accélère la maturation sexuelle et la puberté (Strobel et al, 1995 ; Clément et al, 1998 ; Chehab et al, 1997 ; Yura et al, 2000). La leptine stimule le relargage dans la circulation sanguine de la GnRH dans l'hypothalamus, son taux d'expression variant selon les secteurs de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Cunnigham et al, 1999 ; Herrid et al, 2008 ; Wu et al, 2010b). Le récepteur de la leptine est également exprimé par les cellules gonadotropes hypophysaires suggérant que la leptine agit directement sur ces cellules pour réguler la synthèse de la LH et de la FSH. Elle opérerait *via* la voie de signalisation JAK/STAT (Iqbal et al, 2000 ; Jin et al, 2000 ; Frühbeck, 2006 ; Ogasawara et al, 2008 ; Cirillo et al, 2008 ; Wu et al, 2010b). Dans les cellules gonadotropes LβT2, la surexpression d'*Isl1* augmente significativement la synthèse et la sécrétion de la FSH mais pas celles de la LH. L'expression d'ISL1 est fortement stimulée dans les cellules gonadotropes LβT2 après expositions à la GnRH, à l'activine et à la leptine. La baisse d'expression d'ISL1, induite par des RNA interférants, réduit significativement l'effet de la leptine mais n'influence pas les effets stimulants de la GnRH et de l'activine sur la production de LH et de FSH (Wu et al, 2010b).

1.6 Les mécanismes génétiques et épigénétiques potentiellement impliqués dans l'expression des gènes

1.6.1 Modifications épigénétiques

L'ADN s'enroule d'1,65 tour (146 pb) autour d'un octamère protéique composé d'homodimères d'histones H2A, H2B, H3 et H4 créant ainsi 14 points de contact ADN/protéines (Luger et al, 1997). L'ADN et les histones composent le nucléosome, l'unité de compactage du matériel génétique. D'autres protéines telles que l'histone H1 vont permettre la formation d'états chromatinien plus condensés allant jusqu'à la formation du chromosome mitotique. Afin de remanier la structure de la chromatine, des enzymes spécifiques modifient les histones et l'ADN. Certains résidus au sein des séquences peptidiques des histones subissent ainsi des modifications covalentes. A l'issue de ces modifications la chromatine s'ouvre rendant l'ADN plus accessible pour la transcription ou se condense, empêchant les facteurs de transcription d'accéder à leurs éléments de réponse. Ces régulations chromatinien et transcriptionnelles sont dictées par ces modifications post traductionnelles des histones formant un code spécifique marquant de façon épigénétique le locus particulier d'un gène. Ce dernier est décrypté par des protéines régulatrices traduisant des états chromatinien particuliers : actifs, répressifs, inactifs, permissifs. (**Figure 7**) (Turner et al, 2002 ; pour revue Kouzarides, 2007 ; pour revue Berger, 2007 ; pour revue Li B et al, 2007).

1.6.1.1 Modifications des histones

La régulation de l'expression des gènes requiert différentes modifications des histones. L'acétylation sur des résidus Lys, la méthylation sur des résidus Arg et Lys, la phosphorylation sur des résidus Ser et Thr et l'ubiquitinylation sur certains résidus Lys sont impliquées dans l'activation transcriptionnelle. En revanche, la méthylation sur d'autres résidus Lys, l'ADP-ribosylation sur des résidus Glu, la sumoylation sur des résidus Lys, la déimination des résidus Arg, l'isomérisation de la proline et l'ubiquitinylation sur d'autres résidus Lys sont impliquées dans la répression transcriptionnelle. Les modifications que subissent les histones s'influencent les unes les autres et influent sur l'état de la chromatine. Le code formé par les modifications épigénétiques est lu par des protéines non-histones se

liant sur les résidus modifiés influençant la transcription des gènes, la réparation de l'ADN, la réplication et la condensation de la chromatine (Liu et al, 2005 ; pour revue Li et al, 2007 ; pour revue Kouzarides, 2007 ; pour revue Berger, 2007). La combinaison des différentes modifications entraîne une réponse spécifique (Strahl et Allis, 2000 ; Jenuwein et al, 2001 ; Ray-Gallet et al, 2005). Par exemple : l'acétylation de la Lys14 de l'histone H3 inhibe la méthylation de la Lys9 de l'histone H3 (pour revue Zhang et al, 2001), l'ubiquitinylation de la Lys123 de l'histone H2B influe sur la méthylation de la Lys4 de l'histone H3 (Briggs et al, 2002).

L'acétylation des histones est réalisée par l'intervention d'un complexe multiprotéique comprenant des enzymes histones acetyltransférases (HAT) et des coactivateurs. Ces complexes permettent l'interaction des facteurs de transcription avec l'ADN et le couplage d'autres complexes protéiques essentiels à la transcription (Sternier et Berger, 2000 ; pour revue Narlikar et al, 2002 ; pour revue Utley et Côté, 2003). Les histones sont toutes susceptibles d'être acétylées au niveau de résidus Lys chargés positivement et positionnés en région N-terminale. La neutralisation de la charge du résidu par l'acétylation réduit les forces d'interaction électrostatique et donc l'affinité entre les histones et l'ADN nucléosomique, permettant l'ouverture de la structure chromatinienne. La chromatine est plus relâchée et l'ADN devient accessible. L'acétylation joue un rôle dans l'activation de la transcription des gènes, la réparation de l'ADN, la réplication et la condensation de la chromatine. Parmi les Lys acétylées, la Lys 9 et la Lys 14 de l'histone H3 (H3K9Ac ; H3K14Ac) sont impliquées dans l'activation transcriptionnelle (pour revue Li et al, 2007 ; pour revue Kouzarides, 2007 ; pour revue Berger, 2007). L'acétylation des Lys sur les régions N-terminales des histones par des HAT semble nécessaire à la mobilisation de complexes peptidiques présentant des sous-unités à bromodomaine entraînant le recrutement de coactivateurs transcriptionnels au niveau des séquences promotrices régulatrices (Hassan et al, 2002).

La méthylation/déméthylation des histones se fait par l'intervention d'enzymes, les histones méthyltransférases (HMT) et les histones déméthylases (HDM) sur des résidus Arg et Lys. Longtemps considérées comme des modifications stables, elles sont au contraire dynamiques, répondant aux signaux de l'environnement et sont impliquées dans divers processus incluant la régulation de la transcription des gènes, la réparation de l'ADN, la mitose et l'assemblage de l'hétérochromatine (Rice et Allis, 2001 ; Bannister et al, 2002). Les

méthylations des résidus Lys4 (mono, di et triméthylation), Lys9 (monométhylation) Lys36 (triméthylation) et Lys79 (monométhylation) de l'histone H3 jouent un rôle essentiel dans l'activation de la transcription des gènes. La Lys9 méthylée joue aussi un rôle de répresseur de la transcription des gènes. Les triméthylations des résidus Lys27 et Lys9 de l'histone H3 répriment la transcription des gènes et la triméthylation de la Lys20 de l'histone H4 rend les gènes silencieux. La méthylation sur les résidus Arg2, Arg17 et Arg26 de l'histone H3 et l'Arg3 de l'histone H4 ont un rôle dans l'activation de la régulation de la transcription des gènes (pour revue Berger, 2007 ; pour revue Kouzarides, 2007 ; pour revue Li B et al, 2007 ; Barski et al, 2007 ; pour revue Kim et al, 2009).

La cartographie de l'état chromatinien du génome humain entier a permis l'analyse des profils de triméthylation des Lys4 et Lys27 de l'histone H3 (H3K4Me3 et H3K27Me3) (Mikkelsen et al, 2007 ; pour revue Barski et al, 2007 ; pour revue Schuettengruber et al, 2007) et donne une description de l'état cellulaire en classant les promoteurs en fonction de leur activité (actifs, réprimés ou entre les deux états) au cours du développement embryonnaire. Les marques H3K4Me3 sont catalysées par des protéines du groupe Trithorax (TrxG) (Byrd et Shearn, 2003 ; Dou et al, 2005 ; Wysocka et al, 2005 ; pour revue Schuettengruber et al, 2007) et sont détectées dans les régions promotrices de gènes fortement transcrits. En revanche il semblerait que le taux de H3K4Me3 diminue au niveau des sites d'initiation de la transcription (entre -200 et +50) corrélant alors avec le déplacement du nucléosome associé aux gènes actifs. Le taux de H3K4Me3 est également corrélé avec le taux d'expression des gènes associés (Roh et al, 2005-2006 ; Bernstein et al, 2005 ; Kim TH et al, 2005 ; pour revue Barski et al, 2007. Mikkelsen et al, 2007). La modification H3K27Me3 est catalysée par des protéines du groupe Polycomb (PcG) (Cao et Zhang, 2004 ; pour revue Schuettengruber et al, 2007). Leur présence est en étroite correspondance avec la répression de la transcription des gènes (Boyer et al, 2006 ; Lee et al, 2006 ; Roh et al, 2006). Dans les cellules souches embryonnaires, H3K4Me3 et H3K27Me3 colocalisent au sein de promoteurs dits « bivalents », prêts à être activés ou réprimés suivant le destin future de la cellule suggérant l'implication de ces marques dans la différenciation cellulaire (Bernstein et al, 2006 ; Roh et al, 2006 ; Mikkelsen et al, 2007 ; pour revue Barski et al, 2007). Les promoteurs bivalents montrent une faible activité malgré la présence de H3K4Me3, insinuant que les effets répressifs de l'activité des PcG sont généralement dominants sur l'activité ubiquiste des

TrxG (Mikkelsen et al, 2007). Certaines études qualifient cette balance entre H3K4Me3 et H4K27Me3 de modèle « Yin-Yang ».

1.6.1.2 **Modification de l'ADN**

Dans le génome mammalien, les plantes et les champignons, la méthylation de l'ADN est une modification covalente que peuvent subir toutes les bases azotées de l'ADN. La cytosine est la base la plus fréquemment modifiée par méthylation. Pour cela, il est nécessaire qu'elle soit suivie d'une guanine, formant ainsi un dinucléotide CpG. Cette modification consiste en l'ajout d'un groupement méthyl (CH₃) sur le carbone 5 à la place de l'atome d'hydrogène. Entre 70 et 80% des cytosines du génome situées dans des dinucléotides CpG sont concernées par la méthylation. Les dinucléotides CpG sont distribués de façon inégale dans le génome humain et sont en général concentrés au niveau de régions appelées îlots CpG, dans lesquelles ces dinucléotides ne sont généralement pas méthylés. La méthylation de l'ADN est un processus héritable et hautement dynamique durant le développement embryonnaire, la réplication, la réparation de l'ADN, la transcription des gènes, la condensation de la chromatine et la mitose (Gardiner-Garden et Frommer, 1987 ; Bird, 2002 ; pour revue Suzuki et Bird, 2008 ; pour revue Kim JK et al, 2009 ; pour revue Deaton et Bird, 2011 ; Lienert et al, 2011). La méthylation de l'ADN s'effectue grâce à l'intervention d'une famille d'enzymes, les DNA méthyltransférases (DNMT) qui permettent également le maintien des profils de méthylation lors de la réplication de l'ADN (Goll et Bestor, 2005 ; Klose et Bird, 2006 ; pour revue Garcia-Carpizo et al, 2011). La distribution des profils de méthylation au sein du génome est très spécifique de chaque tissu et type cellulaire. Cette distribution joue un rôle dans la régulation de l'expression des gènes. La méthylation des CpG au sein des régions régulatrices et promotrices d'un gène s'accompagne le plus souvent d'une répression transcriptionnelle. La présence du groupement méthyl sur les CpG empêcherait l'interaction entre les gènes et les protéines effectrices, telle que l'ARN polymérase II, la transcription étant alors réprimée (Lienert et al, 2011 ; pour revue Deaton et Bird, 2011).

Des liens fonctionnels ont été mis en évidence entre la méthylation de l'ADN, la séquence de l'ADN et les modifications des histones. Ils contribueraient à l'établissement du profil de méthylation au sein du génome mammalien durant les différents processus affectant la cellule chez l'embryon et chez l'adulte et à l'apparition des méthylation *de novo* (Tamaru et

Selker, 2001 ; Jackson et al, 2002, Lienert et al, 2011 ; pour revue Deaton et Bird, 2011). La transcription des gènes diminue lorsque la méthylation des CpG sur les régions promotrices s'étend et que les marques d'inactivité des histones se déposent (H3K27Me3). En revanche, l'augmentation du taux de transcrits d'un gène corrèle avec la diminution de la méthylation au sein des régions promotrices et l'augmentation des marques d'activités sur les histones (H3K4Me3, H3K9/14Ac) (Lienert et al, 2011 ; Laursen et al, 2011 ; pour revue Deaton et Bird, 2011).

La modification H3K4Me3 est une marque d'activité transcriptionnelle dépendant de séquences d'ADN riches en CpG même en absence de l'ARN polymérase II. La densité des CpG au sein des ilots est corrélée avec le taux d'H3K4Me3. A elle seule, cette densité influence la modification de l'état chromatinien (Thomson et al, 2010 ; Illingworth et al, 2010).

Les ilots CpG constituent deux groupes : 50% sont situés en 5' au niveau des promoteurs proximaux des gènes associés et la moitié restante constitue les ilots CpG « orphelins » situés aux niveaux intergénique et intragénique. Il y a une corrélation entre la distribution des sites d'initiation de la transcription dans le génome et la position des ilots CpG. Ces observations sont compatibles avec l'idée que les promoteurs possédant des ilots CpG adoptent un état permissif transcriptionnel où l'initiation de la transcription peut s'effectuer dans une région d'une centaine de paires de bases. L'accrochage de l'ARN polymérase II est favorisé par un certain nombre de facteurs ubiquistes comme SP1 dont les éléments de réponse sont riches en bases C et G et donc plus fréquents dans les ilots CpG. L'ARN polymérase II phosphorylée sur la Ser5, présente au site d'initiation de la transcription, s'y fixera préférentiellement même lorsque le gène associé est inactif (Carninci et al, 2006 ; Core et al, 2008 ; Seila et al 2008 ; Juven-Gershon et al, 2008 ; Landolin et al, 2010 ; pour revue Deaton et al, 2011).

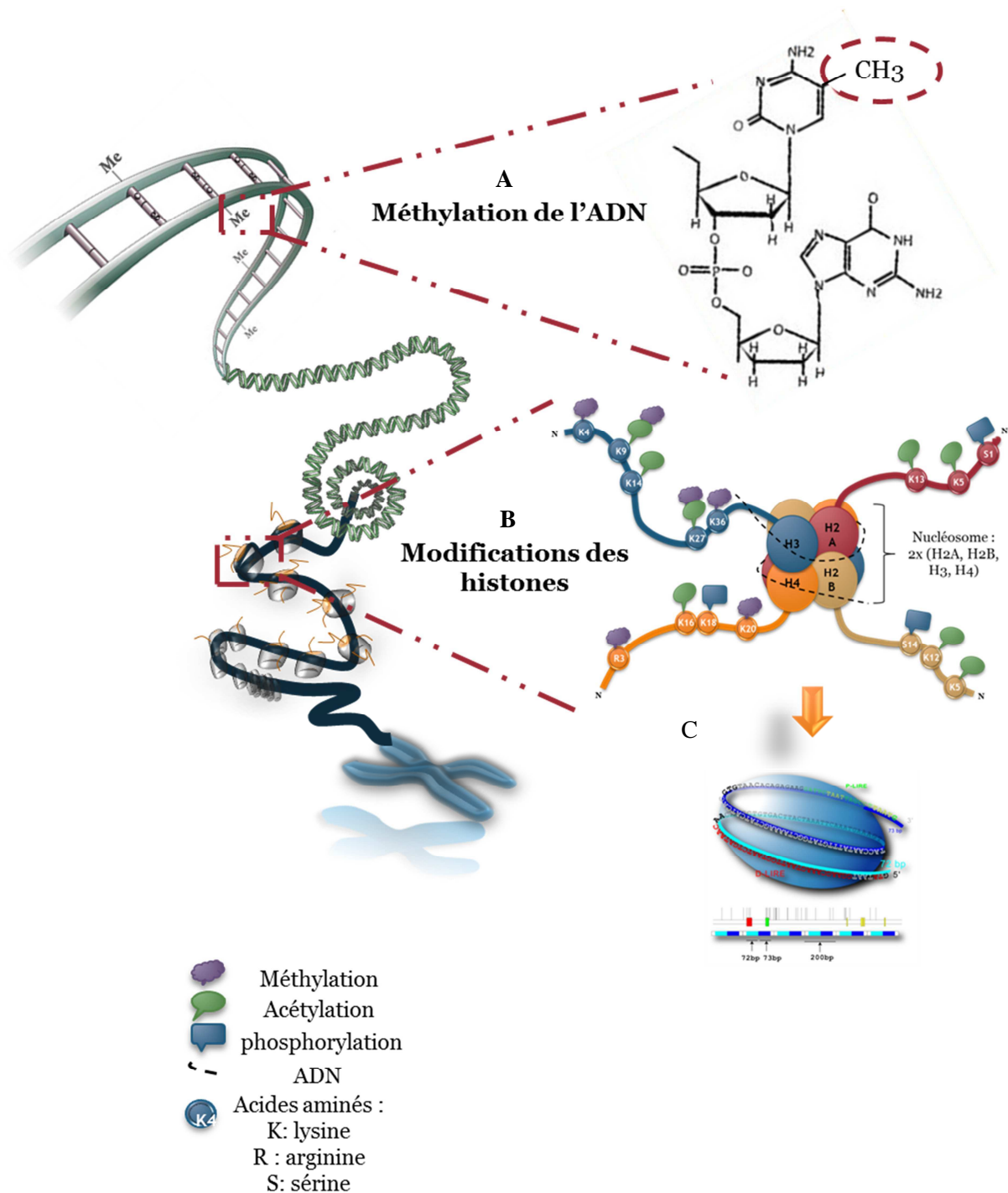


Figure 7
Les modifications épigénétiques des histones et de l'ADN

Les chromosomes visibles au cours de la mitose sont les formes condensées de la chromatine. La condensation est permise par l'intervention de protéines comme les histones H1 et le nucléosome formée de deux copies des histones H2A, H2B, H3 et H4 (B). L'ADN s'enroule de 1.65 tour (146 pb) autour du nucléosome (C). L'ADN est organisée en double hélice et est formée de phosphate, de désoxyribose et de quatre bases : A/T/G/C. La méthylation de l'ADN (A) est l'ajout d'un groupement méthyle sur le carbone 5 de la cytosine. Les modifications des histones (B) constituant le nucléosome sont de plusieurs types : les lysines et les arginines peuvent être méthylées ou acétylées, les sérines peuvent subir des phosphorylations. L'histone H3 (en vert, B) peut subir des méthylations sur la Lys 4, des méthylations et des acétylations sur les Lys 9 et 27, des acétylations sur la Lys14.

1.7 Les outils utilisés

1.7.1 Les lignées cellulaires

La forte hétérogénéité cellulaire de l'hypophyse antérieure constitue l'un des obstacles majeurs à son étude. Pour surmonter cette difficulté, plusieurs groupes de chercheurs, essentiellement nord-américains, ont contribué à isoler et caractériser différentes lignées cellulaires représentatives des différents types cellulaires endocrines de l'hypophyse antérieure. Ces lignées se sont avérées et s'avèrent toujours des outils précieux pour comprendre le fonctionnement de chaque type cellulaire, les mécanismes impliqués dans la synthèse et la libération de chacune de ces hormones ainsi que leur régulation. Au cours de cette étude, nous avons mis à profit cette situation en comparant l'expression des gènes hypophysaires dans quatre lignées bien caractérisées : les cellules L β T2, α T3-1, GH3B6 et AtT20. A ces lignées hypophysaires, nous avons adjoint l'étude d'autres lignées cellulaires représentatives des neurones à GnRH, les cellules GT1-7, des lignées neutres comme les cellules CHO, COS1 et COS7, une lignée rétinienne, les cellules RGC5 et une lignée de type neuronale, les cellules PC12. Nous décrivons ci-dessous les caractéristiques de la lignée hypothalamique et des lignées hypophysaires qui ont fait l'objet des analyses les plus approfondies.

1.7.1.1 Les cellules GT1-7

Ce sont des lignées immortalisées de neurones à GnRH hypothalamiques obtenues par oncogénèse ciblée. L'antigène T du virus SV40 (Simian Virus 40), placé sous contrôle du promoteur de la GnRH de rat a été intégré dans le génome murin (Mellon et al, 1990 ; Wetsel et al, 1991). Les tumeurs obtenues *in vivo* chez l'animal ont ensuite été mises en culture puis les cellules ont été clonées pour établir des lignées. Après caractérisation, la lignée GT1-7 s'est avérée représentative des neurones hypothalamiques à GnRH : elles sécrètent la GnRH par pulse et de façon synchronisée (Weiner et al, 1992), expriment les récepteurs aux œstrogènes et aux androgènes (Belsham et al, 1998 ; Roy et al, 1999 ; Poletti et al, 2001) et répondent à une action directe des stéroïdes.

1.7.1.2 *Les cellules α T3-1*

Les α T3-1 sont des lignées cellulaires hypophysaires immortalisées obtenues par oncogénèse dirigée, selon la même démarche expérimentale utilisée pour l'obtention des lignées GT1-7 (Mellon et al, 1990). Des souris transgéniques furent créées en intégrant dans leur génome une construction comprenant la séquence codante de l'antigène T du virus SV40 sous le contrôle du promoteur humain de la sous-unité α (Windle et al, 1990). Des adénomes hypophysaires se sont développés et des cellules furent prélevées pour être mises en culture afin de sélectionner quelques clones cellulaires, parmi eux les α T3-1. Elles expriment les gènes codant la sous-unité α , le récepteur de la GnRH et le facteur stéroïdogénique (SF1) mais pas les gènes codant les sous-unités β de la LH et la FSH. La transcription du gène *Cga* est induite par la GnRH. Ces cellules ont les caractéristiques des cellules gonadotropes immatures exprimant à leur surface le GnRHR (Tsutsumi et al, 1992) et ne produisant pas d'hormones gonadotropes (Ingraham et al, 1994 ; Fink et al, 2010). Ces cellules sont très utilisées dans l'étude des voies de signalisations induites par la liaison de la GnRH sur son récepteur, mais également dans les études de régulations géniques (pour revue Ooi et al, 2004).

1.7.1.3 *Les cellules L β T2*

Comme précédemment, des souris transgéniques ont été créées en intégrant dans leur génome une construction comprenant la séquence codante de l'antigène T du virus SV40 sous le contrôle du promoteur du gène de la sous-unité β de la LH de rat (Alarid et al, 1996 ; Thomas et al, 1996). Ces cellules expriment les gènes codant la sous-unité α , le récepteur de la GnRH, SF1 mais également les sous-unités β de la LH et la FSH (Turgeon et al, 1996 ; Pernasetti et al, 2001 ; Otsuka et Shimasaki, 2002). Ces cellules sécrètent la LH et la FSH en réponse aux pulses de la GnRH (Turgeon et al, 1996) qui sont stockées dans des grains de sécrétion. Ces cellules ont les caractéristiques des cellules gonadotropes matures exprimant à leur surface le GnRHR et répondant aux pulses de la GnRH en sécrétant les gonadotrophines. Ce sont de très bons modèles d'études des voies de signalisation activées par la GnRH mais aussi des modulations induites par diverses régulations physiologiques (pour revue Ooi et al, 2004 ; Fink et al, 2010). Ces cellules sont également de très bons modèles pour analyser les rétrocontrôles hormonaux sur les gonadotrophines et les régulations par l'activine, l'inhibine ainsi que d'autres membres de la superfamille des TGF β .

1.7.1.4 *Les cellules GH3B6*

Cette lignée cellulaire est un sous-clone de la lignée GH3 qui elle-même dérive de tumeurs adénohypophysaires de rat MtT/W5 après 3 passages alternatifs en culture et chez l'animal. Les cellules GH3 produisent de l'hormone de croissance (GH) et de la prolactine (PRL) dont la sécrétion est régulée par la TRH et le VIP (Bancroft et al, 1969 ; Tashjian et al, 1970 ; Tixier-Vidal et al, 1978 ; Gourdj et al, 1982 ; Laverrière et al, 1986 ; pour revue Ooi et al, 2004). Ces cellules présentent les caractéristiques de cellules lacto-somatotropes : certains récepteurs dont celui des œstrogènes ou de l'EGF sont exprimés à leur surface et les voies de signalisation de l'AMPC et de SMAD sont fonctionnelles (pour revue Ooi et al, 2004). Les cellules GH3 répondent à la leptine et expriment à leur surface son récepteur (Jin et al, 2000). Elles sont aussi utilisées pour étudier les régulations des ions calcium, potassium ou sodium par des techniques de patch clamp (pour revue Ooi et al, 2004).

1.7.1.5 *Les cellules AtT20*

Cette lignée cellulaire de cellules corticotropes est utilisée pour étudier les fonctions et les régulations par les glucocorticoïdes et cytokines de la *POMC* (Tanaka et al, 1991 et 1997 ; Li et al, 1999 ; pour revue Ooi et al, 2004). Cette lignée cellulaire fut obtenue en alternant les passages en cultures et chez l'animal (souris). Ces cellules tumorales produisent l'ACTH et l' α MSH à partir du précurseur POMC (Furth et al, 1953 ; Buonassisi et al, 1962). Ces cellules sont petites et prolifèrent en agrégats pour former des clusters. Les AtT20 utilisées dérivent des AtT20/D16v-F2 (Gumbiner et al, 1981). Elles possèdent les caractéristiques des cellules corticotropes de l'adénohypophyse. Les hormones sont correctement synthétisées et l'ACTH, clivée par des prohormones convertases à partir de la POMC, est sécrétée par exocytose (Zhou et al, 1994 ; El Meskini et al, 2000). Certains facteurs dont le CRH, le VIP ou encore l'IL-6 régulent la sécrétion des endorphines et de l'ACTH dans cette lignée cellulaire hypophysaire (Fukata et al, 1989). Ces cellules possèdent à leur surface un certain nombre de récepteurs (pour revue Ooi et al, 2004). Elles constituent des contrôles négatifs particulièrement adéquats pour notre étude puisqu'elles n'expriment aucun des gènes marqueurs du phénotype cellulaire gonadotrope comme SF1, le GnRHR, la LH, ou le FSH.

1.8 Objectifs

Initialement, compte tenu des données collectées au laboratoire, mon objectif consistait à décrire et préciser les interactions entre FOXL2, un facteur de transcription appartenant à la famille Forkhead et ISL1. Ces données, en accord avec la littérature, suggéraient qu'*Isl1* était la cible de FOXL2. Pour le démontrer, nous avons mis en œuvre des expériences de transfection transitoire combinant le promoteur de 5 kb d'*Isl1* et un vecteur d'expression FOXL2. Ce type d'approche exige le plus souvent l'utilisation de lignées cellulaires "neutres" qui n'expriment pas le ou les facteurs à tester (FOXL2 et ISL1, en l'occurrence). De façon tout à fait inattendue, nous avons observé une activité systématique et élevée du promoteur transfecté d'*Isl1* dans toutes les lignées testées, des plus neutres aux plus spécifiques, suggérant que le promoteur endogène pouvait être soumis majoritairement à des régulations épigénétiques. En effet, comme nous allons l'illustrer dans le chapitre suivant, seul un nombre réduit de ces lignées exprimait les ARN messagers d'*Isl1*. Dans les lignées n'exprimant pas les ARNm d'*Isl1*, le gène endogène et son promoteur étaient probablement réprimés *via* des modifications épigénétiques entraînant la formation d'une structure chromatinienne fermée, régulations auxquelles échappait le promoteur transfecté. C'est ainsi que nous avons entrepris de déterminer la nature de ces régulations épigénétiques en utilisant différents modèles cellulaires, dont ceux décrits ci-dessus, et en privilégiant l'analyse des marques d'activité et d'inactivité des histones avant d'amorcer l'étude des profils de méthylation de l'ADN.

2 Matériels et méthodes

2.1 Les anticorps

Les anticorps utilisés pour les ChIP sont les suivants : l'anticorps polyclonal anti-histone H3 (trimethyl K4Me3) (ab8580 - ChIP grade), l'anticorps polyclonal anti-histone H3 (trimethyl K27Me3) (ab6002-ChIP grade), l'anticorps polyclonal anti-ARN polymérase II CTD repeat YSPTSPS (phosphoSer5) (ab5131 - ChIP Grade) de Abcam (Cambridge, UK), l'anticorps polyclonal anti-acetyl-Histone H3 (K9-K14) (Millipore 06-599), l'anticorps polyclonal anti-acetyl-Histone H3 (K14) (Millipore 07-353). Les anticorps utilisés pour les immunohistochimies sont : l'anti-ISL1 (394D5), qui est un monoclonal produit au laboratoire à partir d'un hybridome obtenu auprès du Developmental Studies Hybridoma Tissue Bank (National Institute of Child Health and Human Development - University of Iowa - Department of Biological Sciences, Iowa City, IA) ; l'anti-FOXL2 utilisé au 1/300^{ème} (Cocquet et al, 2002) ; l'anticorps polyclonal anti-TSH β , fait chez le rat (NIDDK (NIH), number IC-1, AFP-1274789) dilué à 1/200^{ème} ; l'anticorps monoclonal anti-LH β fait chez le bovin, utilisé à 1/300^{ème} (number 518B7, Matteri et al, 1987) ; DAPI.

2.2 Culture cellulaire

Les cellules gonadotropes de souris α T3-1 et L β T2, fournies par le Dr P. Mellon (La Jolla, CA), les cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO), les cellules lacto-somatotropes GH3B6 de rat, les cellules corticotropes AtT20 de souris et les cellules hypothalamiques GT1-7 de souris ont été maintenues en culture dans un milieu DMEM complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et 50 μ g/ml de pénicilline/streptomycine à 37 ° C, en atmosphère humide à 5% de CO₂, 95% d'air.

2.3 Etudes de l'activité du promoteur : enzymes de restriction et constructions

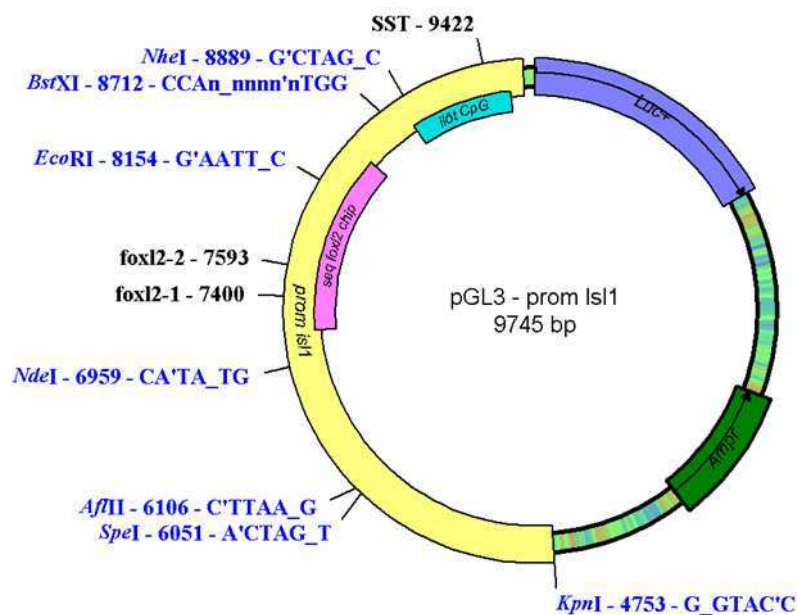
Afin d'étudier l'activité du promoteur du gène *Isl1*, des constructions ont été réalisées. Le promoteur de 5kb (-4674 / +222 pb) en amont et en aval du site d'initiation de la

transcription du gène *Isl1* a été inséré dans le plasmide pGL3 basic vector de Promega de 4818 pb par l'équipe de Sylvia Evans (Lin et al, 2007).

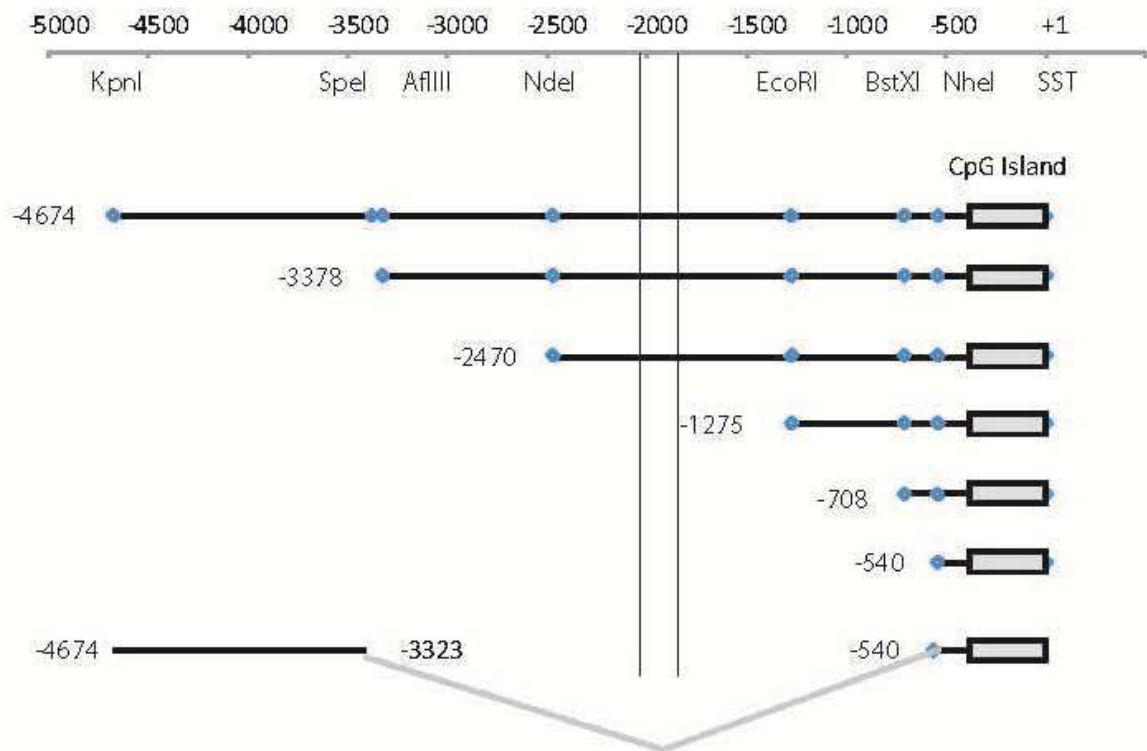
En 5': 5'-GATGGTACCCTCAACTAAATGAGGCTAC-3'.

En 3': 5'-ATTGTCGACTTGTAAGAGGGAGTA-3'.

Des constructions ont été réalisées avec différentes enzymes de restriction (Fermentas et Promega) présentant un site dans la partie du promoteur inséré dans le plasmide. Deux constructions ont été réalisées au départ : l'une digérée par KpnI et une autre par le couple d'enzyme de restriction SpeI/NheI. La construction coupée par KpnI a été ensuite recoupée avec plusieurs enzymes : soit AflIII, BstXI, NdeI, NheI ou EcoRI. Les bactéries compétentes DH5α ont été transformées par ces constructions, mises en culture et les plasmides extraits et purifiés. Après dosage de l'ADN et digestion avec NotI, les plasmides ont été vérifiés par migration sur gel. 6 constructions ont ainsi été réalisées (cf schémas et séquence ci-dessous) :



Le schéma (obtenu avec le logiciel pDRAW32) montre la construction entière du pLuc5.0*Isl1* : il fait 9745 pb, contient la séquence firefly Luciférase (Luc+), la séquence lui conférant la résistance à l'ampicilline (Ampr) et le promoteur du gène *Isl1*.



La séquence ci-contre est celle intégrée dans le vecteur. Le promoteur (en jaune) contient : la zone probable de fixation du facteur de transcription FOXL2 mise en évidence lors d'expérience de ChIP on Chip (en rose sur le schéma et surligné en vert en majuscule au niveau de la séquence ci-contre, les motifs surlignés en jaune sur la séquence seraient les motifs de liaison avec FOXL2) et l'îlot CpG (en bleu turquoise sur le schéma et mis en évidence en italique/gras sur la séquence ci-contre). La séquence montre les emplacements des enzymes de restriction par rapport au site d'initiation de la transcription (signalé SST+1), les amorces 5' et 3' utilisées pour intégrer la séquence dans le vecteur. La séquence mise en évidence en bleu turquoise est celle du premier exon, la séquence en italique/gras délimite l'îlot CpG. Le codon ATG est signalé à titre indicatif mais n'est pas présent dans la séquence du promoteur intégré au vecteur.

[illegible]

2.4 Transfection transitoire

Les dilutions des plasmides sont réalisées à partir de solution mère à 200 ng/μl pour les vecteurs luciférase et à 30 ng/μl pour les vecteurs d'expression. La quantité maximale de vecteur luciférase est de 100 ng/puits et celle de vecteur d'expression de 50 ng/puits tout en sachant que l'action optimale est généralement obtenue à 10 ng/puits. La quantité de vecteur témoin de transfection pRL-TK ou pRL-SV est comprise entre 5 et 10 ng/puits selon l'efficacité de la transfection des cellules. Les conditions par puits sont les suivantes :

5 μl d'OptiMEM additionné de 10 ng de pRL-TK sont ajoutés au mélange de plasmides à tester. En parallèle, 5 μl d'OptiMEM sont ajoutés à 0.5 μl de LipofectAMINE2000 réactif (Life Technologies, Gaithersburg, MD). La lipofectamine diluée est incubée 5 minutes à température ambiante puis ajoutée à la solution de plasmides afin d'obtenir le mélange de transfection. Ce mélange est incubé 25 minutes sous hotte à température ambiante.

Pendant ce temps, les cellules en culture des lignées αT3-1, LβT2, GT1-7, GH3B6, AtT20, PC12 et CHO sont détachées du support de culture par traitement enzymatique à la trypsine. La digestion enzymatique est stoppée par ajout de milieu de culture complet (5 ml de DMEM 10% SVF + pénicilline/streptomycine) et les cellules sont centrifugées. Les cellules sont alors reprises dans un volume équivalent à 40 μl par puits d'OptiMEM pour une plaque de 96 puits. Les cellules sont distribuées dans les tubes contenant le mélange ADN/LipofectAMINE2000 avant d'être réparties dans les puits de culture à raison de 50 μl/puits. Les dépôts se font en triplicat, soit 120 μl de suspension de cellules pour 30 μl de mélange de plasmides.

Les plaques de 96 puits sont incubées à 37°C pendant 5 heures puis 50 μl par puits de milieu de post-transfection (DMEM ; 4 % SVF ; 10 U/ml de pénicilline et 10 μg/ml de streptomycine) sont ajoutés puis les plaques sont remises à 37°C pendant 48 heures avant de mesurer les activités luciférases (Dual-Luciferase® Reporter assay system, Promega).

2.5 Extraction de protéines nucléaires et western blot

2.5.1 Extractions nucléaires des cellules en culture

Les cellules α T3-1, GH3B6, L β T2, AtT20, PC12 et GT1-7 sont cultivées dans des boîtes P75 afin d'obtenir un nombre de cellules adéquates pour réaliser les extractions de protéines nucléaires. Les boîtes de cellules en culture sont rincées deux fois avec 10 ml de PBS 1X afin d'éliminer le milieu de culture. Les cellules sont récupérées par grattage dans 1.5 ml de PBS 1X et transférées dans des tubes de 2 ml. Les tubes sont centrifugés pendant 10 secondes à 4°C à 5000 rpm. Les culots sont repris dans 400 μ l de tampon de lyse 1X [10 mM Tris(HCl) pH7.4 ; 10 mM NaCl ; 3 mM MgCl₂ ; 0,5% NP40 ; 0,5 mM PMSF (solution mère à 250X) ; 1 μ M de pepstatine (solution mère à 250X) ; 1 μ M de leupeptine (solution mère à 250X)]. Après avoir mélangé rapidement, les tubes sont mis à 4°C pendant 5 minutes. Les tubes sont centrifugés pendant 10 secondes à 4°C à 5000 rpm. Les surnageants sont conservés et les culots sont repris à nouveau dans 200 μ l de tampon de lyse. Après les avoir mélangés, les tubes sont centrifugés pendant 10 secondes à 4°C à 5000 rpm. Les surnageants sont récupérés et sont regroupés avec les premiers. Les culots restants sont repris dans 50 μ l de tampon C [20 mM HEPES pH7.9 ; 420 mM NaCl ; 1,5 mM MgCl₂ ; 0,2 mM EDTA ; 0,5 mM DTT ; 0,5 mM PMSF (solution mère à 250X) ; 1 μ M de pepstatine (solution mère 250X) ; 1 μ M de leupeptine (solution mère à 250X)] et sont incubés pendant 30 minutes à 4°C sous agitation. Les tubes contenant le tampon C et les surnageants sont ensuite centrifugés pendant 15 minutes à 4°C à 18000 rpm. Les surnageants constituent les extraits nucléaires et cytosoliques. Les concentrations en protéines sont déterminées par dosage de Bradford puis les extraits sont aliquotés et conservés à -20°C et à -80°C.

2.5.2 Les westerns blot

Afin de réaliser l'étude par western blot de la protéine nucléaire ISL1 dans les différentes lignées, 15 μ g de protéines sont dénaturés par chauffage pendant 10 min à 90°C dans un tampon Laemmli 1X [62,5 mM Tris-HCl (pH6.8) ; 2% SDS ; 10% glycérol ; 5% de β -mercaptoéthanol ; bleu de bromophénol (traces)]. Les protéines sont ensuite séparées par électrophorèse PAGE-SDS à 200 V avec un tampon de migration Tris-Glycine-SDS [25 mM Tris (pH8.3) ; 192 mM glycine ; 0,1% SDS] et transférées sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare) avec le même tampon contenant 20% d'éthanol pendant 70 minutes à 300

mA. Après transfert, les membranes sont incubées dans une solution de blocage TBS-Tween 0,1% [TBS : 50 mM Tris (pH7.5) ; 150 mM NaCl] contenant 5% de lait pendant 1h à température ambiante, elles sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du TBS-Tween 0,1% - lait 5% à 4°C pendant la nuit sous agitation. Après 3 lavages de 5 minutes les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase pendant 1h à température ambiante sous agitation. Les bandes sont révélées par le lecteur de chimiluminescence LAS3000 (Lifescience Fujifilm) en utilisant un réactif Luminol (ECLTMPlus, GE Healthcare Life Sciences). Les résultats sont analysés en utilisant la β -actine comme protéine de référence, le programme Photoshop Adobe pour réaliser les montages d'images des westerns blot et le programme Image J pour les estimations densitométriques.

2.6 Immunoprécipitation de chromatine (ChIP)

Les expériences de ChIP sont réalisées sur les cellules α T3-1, GH3B6, L β T2, AtT20 et GT1-7. Chaque type cellulaire a été cultivé dans deux bouteilles de 75 cm². Les cellules sont utilisables lorsque qu'elles sont arrivées à confluence. Plusieurs étapes sont nécessaires :

2.6.1 Le Cross-linking

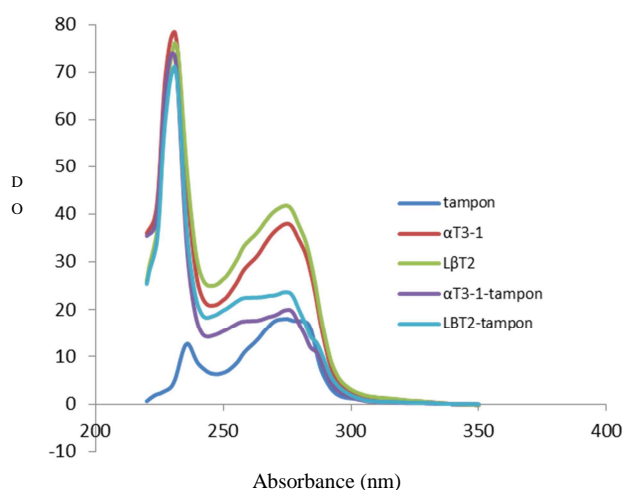
Du formaldéhyde à 37% est préparé extemporanément à partir de paraformaldéhyde. Pour cela, 1,85 g de paraformaldéhyde est pesé et mis dans un tube falcon de 15 ml avec 3,6 ml d'H₂O et 70 μ l de KOH 1N. Le tube falcon entrouvert est placé dans un bécher rempli d'eau et placé dans un four à micro-onde sous hotte. Après solubilisation du formaldéhyde, le niveau est complété à 5 ml d'eau si besoin afin que le formaldéhyde soit à 37%. 270 μ l de formaldéhyde à 37% sont ajoutés aux 12 ml de milieu de culture (final 1%) et mélangés rapidement. Les bouteilles sont laissées sous hotte pendant 10 minutes à température ambiante. Après les 10 minutes d'incubation, le milieu est aspiré et 12 ml par boîte de solution d'arrêt [125 mM glycine ; qsp 50 ml PBS] sont ajoutés. Les cellules sont incubées pendant 10 min en présence de la solution d'arrêt qui est ensuite éliminée et les boîtes sont rincées deux fois avec du PBS.

2.6.2 L'extraction des noyaux

Afin d'extraire les noyaux des cellules, 10 ml de tampon N1 [10 mM HEPES pH7.9 ; 10 mM EDTA ; 0,5 mM EGTA ; 0,25% de Triton X-100 ; 10 mM de β -Glycérophosphate ; 1 mM d'Orthovanadate ; qsp 200 ml H₂O] sont ajoutés dans chaque bouteille. L'incubation est réalisée sur la glace pendant 10 min sous agitation douce. Les cellules sont récupérées par grattage dans le tampon N1, rassemblées dans des tubes Falcon de 50 ml et centrifugées pendant 5 min à 500 g. Les surnageants sont aspirés, les culots sont remis en suspension dans 40 ml de tampon N2 [10 mM HEPES pH7.9 ; 200 mM NaCl ; 1 mM EDTA pH8 ; 0,5 mM EGTA pH8 ; 0,01% de Triton X-100 ; 10 mM de β -Glycérophosphate ; 1 mM d'Orthovanadate ; qsp 100 ml d'H₂O] et incubés sur glace pendant 10 minutes sous agitation douce. Les tubes sont à nouveau centrifugés pendant 5 minutes à 500 g à 4°C. Les culots nucléaires sont repris dans 2 ml de tampon de lyse [50 mM HEPES pH7.9 ; 140 mM NaCl ; 1 mM EDTA pH8 ; 1% de Triton X-100 ; 0,1% Na desoxycholate ; 10 mM de β -Glycérophosphate ; 1 mM d'Orthovanadate ; qsp 40 ml H₂O] et transférés dans des tubes Falcon de 15 ml. Les culots sont soniqués 4 fois 25 secondes à 90% (sonicateur Vibra-Cell équipé d'une microsonde). La chromatine est transférée dans des tubes de 2 ml et centrifugée pendant 10 minutes à 4°C à 15000 rpm. Les surnageants sont transférés dans des tubes de 2 ml.

2.6.3 L'immunoprécipitation

La concentration en chromatine (DO 260/280) est mesurée au Nanodrop. Les absorbance à 260 nm, à 280 nm ainsi que les rapports 260/230 et 260/280 sont relevés. Le tampon de lyse absorbe à 260 nm, il est donc important de retrancher l'absorbance de ce dernier à celle de l'échantillon. Ci-dessous un exemple de courbe obtenue par mesure au Nanodrop :



On utilise 1,5 à 2 unités DO260 par immunoprécipitation.

anticorps	Concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Quantité à ajouter
Anti-Pol II CTD repeat YSPTSPS (phospho S5)	0,6	3,3 μl
Anti-acetyl-Histone H3 (Lys 14)	1	2,0 μl
Anti-acetyl-Histone H3 (K14-K9)	1	2,0 μl
Anti-Histone H3 (tri methyl K4)	1	2,0 μl
Anti-Histone H3 (tri methyl K27)	1	2,0 μl

Le volume maximal par immunoprécipitation est fixé à 350 μl , le volume des billes de protéine A-agarose/ADN de sperme de saumon (Millipore™ ref : 16-157) utilisé est de 50 μl par immunoprécipitation. En plus des 5 anticorps utilisés, un sixième tube ne contiendra pas d'anticorps et constituera le contrôle négatif. La chromatine en solution est diluée volume pour volume avec le tampon de dilution (0,02 mM Tris(HCl) pH8 ; 2 mM EDTA pH8 ; 150 mM NaCl ; 1% de Triton X-100 ; 0,01% de SDS ; 10 mM de β -Glycérophosphate ; 1 mM d'Orthovanadate ; qsp 40 ml H₂O) afin d'optimiser les conditions d'immunoprécipitation. Le volume final de l'input 50% est de 300 μl : 150 μl de chromatine soniquée et 150 μl de tampon de dilution.

Les solutions de chromatine (350 μl /anticorps) sont préincubées avec les billes d'agarose couplées à la protéine A pendant 30 minutes à 4°C sous agitation puis centrifugées. Cette étape permet d'éliminer les facteurs se liant de manière non spécifique aux billes d'agarose. Les surnageants chromatinien ainsi traités sont récupérés et les anticorps ajoutés. La chromatine est incubée une nuit à 4°C sous agitation avec les anticorps. Afin d'illustrer cette méthode, un tableau récapitulatif de trois immunoprécipitations pour trois lignées cellulaires, GT1-7, AtT20 et L β T2 est présenté ci-dessous

Ajuster la DO/IP entre 1 et 2 (généralement 1,5)

Traitements & lignées			
	AtT20	GT1-7	LbT2
	Contrôle	Contrôle	Contrôle
Chrom. Sonic. DO ₂₆₀ /ml	9,7 DO	9,2 DO	8,9 DO
Pour 1,5 DO/IP	155 µl	163 µl	169 µl
ChIP Lysis Buffer	20 µl	12 µl	6 µl
Dilution Buffer	175 µl	175 µl	175 µl
Vol total IP	350 µl	350 µl	350 µl
1/Préparer la chromatine	AtT20	GT1-7	LbT2
	Contrôle	Contrôle	Contrôle
Chromatine soniquée	990 µl	1050 µl	1080 µl
+ ChIP Lysis Buffer	130 µl	80 µl	40 µl
Total	1120 µl	1130 µl	1120 µl
Nbre d'IP	x6	x6	x6
2/Préparer les billes			
Vol Billes à laver	320 µl	320 µl	320 µl
1X dans Dilution buffer par	640 µl	640 µl	640 µl
Reprendre à la fin dans Dilution Buffer	1120 µl	1120 µl	1120 µl
Ajouter la chromatine	1120 µl	1130 µl	1120 µl
Incuber 30 min 4°C et éliminer les billes	Incubation 30 min et centrifugation		
Répartir le surnageant par	350 µl	350 µl	350 µl
3/ajouter l'anticorps			
2,00 µg			
Concentration recommandée ac			
0,35 à 3,5 µg pour 350 µl			
Préparer input 50%			
Chrom. Sonic.	77 µl	82 µl	84 µl
ChIP Lysis Buffer	73 µl	68 µl	66 µl
Dilution buffer	150 µl	150 µl	150 µl
Volume final	300 µl	300 µl	300 µl

Le deuxième jour, les solutions de chromatine immunoprécipitée sont incubées en présence des billes d'agarose couplées à la protéine A pendant 2 heures à 4°C sous agitation pour capturer les anticorps avec les complexes protéine/ADN qu'ils ont piégés.

2.6.4 Le lavage des billes

Les tubes sont centrifugés et les surnageants sont conservés dans des tubes stériles à - 20°C. Les billes sont transférées avec 2 fois 250 µl de tampon de lavage 1 dans des petites colonnes Micro Bio-Spin colonnes (Biorad). Le liquide s'écoule par gravité. Les billes sont lavées successivement :

- 3 fois avec le tampon de lavage 1 contenant 150 mM NaCl [0,025 M Tris(HCl) pH8 ; 2 mM EDTA pH8 ; 150 mM NaCl ; 1% de Triton X-100 ; 0,1% de SDS ; qsp 40 ml H₂O].

- 3 fois avec le tampon de lavage 2 contenant 500 mM NaCl [0,025 M Tris(HCl) pH8 ; 2 mM EDTA pH8 ; 500 mM NaCl ; 1% de Triton X-100 ; 0,1% de SDS ; qsp 40 ml H₂O].
- 3 fois avec le tampon de lavage 3 contenant 250 mM LiCl [0,010 M Tris(HCl) pH8 ; 1 mM EDTA pH8 ; 250 mM LiCl ; 1% de NP40 ; 1% de Na desoxycholate ; qsp 40 ml H₂O].
- 3 fois avec du TE [10 mM Tris(HCl) pH8 ; 1 mM EDTA]

Afin d'éliminer le TE, les tubes avec les colonnes sont centrifugés très brièvement. Les colonnes sont placées sur des tubes 2 ml et 300 µl de tampon d'élution [100 mM NaHCO₃ ; 1% de SDS ; qsp 10 ml H₂O] sont ajoutés au centre de chaque colonne. Elles sont aussitôt fermées par un bouchon afin de retenir le tampon d'élution dans la colonne et permettre une incubation de 2 heures. Au cours de cette incubation, l'éluat est repassé 2 fois à travers la colonne. Les tubes sont centrifugés au bout des 2 heures, et 2 µl de protéinase K à 20 mg/ml sont ajoutés dans chaque tube. Les 300 µl sont répartis en 2x150 µl dans des tubes de 0,5 ml pour PCR. Les tubes sont placés dans le thermocycleur (Crocodile II, Appligene) et incubés à 65°C pendant 8 heures.

2.6.5 Extractions des ADN

Les 2 x 150 µl sont réunis dans un tube de 1,5 ml. Les ADN sont extraits au phénol/chloroforme (V/V) et précipités à l'éthanol en présence de glycogène (5 à 10 µl à 10 mg/ml). Les culots sont repris dans 50 µl d'H₂O pure. Les ADN sont prêts à être utilisés pour les PCR semi-quantitatives et quantitatives en temps réel.

2.7 Analyses de la méthylation

2.7.1 Les PCR semi-quantitatives

Les PCR semi-quantitatives sont effectuées sur les ADN purifiés à, partir des lignées cellulaires. Les amorces utilisées figurent dans le tableau ci-dessous. Toutes les lignées cellulaires sont murines sauf les cellules GH3B6 qui sont des cellules de rat : des amorces spécifiques pour ces cellules ont donc été dessinées. L'enzyme utilisée pour les amplifications est la GoTaq® DNA Polymerase (Promega) et le tampon est celui fourni avec l'enzyme

(tampon 5X avec Mg^{2+} , Promega). Le volume final de la réaction est de 30 μ l par tube, la concentration finale des dNTP est de 0,2 mM (concentration initiale à 10 mM ; Promega), la concentration finale des amorces est de 0,3 μ M (concentration initiale à 3 μ M). La concentration finale en Mg^{2+} est 1.5 mM.

Le mélange pour un point et pour un couple d'amorces donné est le suivant : 6 μ l de tampon 1X + 0.6 μ l dNTP + 2,5 μ l d'amorce sens + 2,5 μ l d'amorce antisens + X μ l d'ADN + qsp 30 μ l H_2O .

Les ADN sont amplifiés dans l'appareil Biorad. Le programme d'amplification est le suivant : dénaturation à 94°C pendant 3 minutes

dénaturation à 94°C pendant 30 secondes	} x 29 cycles
hybridation à 55°C pendant 30 secondes	
élongation à 72°C pendant 30 secondes	
élongation à 72°C pendant 5 minutes.	

La température d'hybridation dépend des amorces utilisées. Après cette première amplification, 6 μ l de chaque échantillon sont prélevés et mis dans des tubes PCR contenant chacun 5 μ l de bleu de charge 1X. Une seconde amplification est effectuée avec 4 cycles supplémentaires, les températures sont les mêmes, seul le nombre de cycle change. Un deuxième prélèvement de même volume est réalisé après l'amplification numéro 2. Et une troisième et dernière amplification de 4 cycles supplémentaires est lancée. Les tubes de cette dernière sont gardés.

En parallèle à la PCR, un gel d'agarose à 1 % est préparé (70 mg d'agarose en poudre ; qsp 70 ml de TAE 1X ; 70 μ l de Bromure d'Ethidium). La première amplification est déposée dans les puits (10 μ l par puits) et migrée pendant 10 minutes. Après l'arrêt de la migration, la deuxième amplification est déposée sur le même gel, dans les puits correspondant à chaque ADN, la migration de ce deuxième dépôt dure 10 minutes et enfin la troisième amplification est déposée selon le même processus. La troisième migration dure 10 minutes. La visualisation des bandes se fait après la troisième migration (appareil Biorad).

Les amorces utilisées :

Qa15 (ss unit α)	mouse	CTGAGGGTTGCAATGTGATA
Qa13 (ss unit α)	mouse	GGCAGTTGATTGTCGATCTGA
QLH5 (LH β)	mouse	GAGTGTGAGGCCAATTCCTG
QLH3 (LH β)	mouse	CTTCCCTACCTTGGGCACCT
Qis15	mouse	CGATGGAGCTGAGTTGGAGC
Qis13	mouse	AGAGAGGATGCTGGTGCTGT
RPr125	rat	ATCCTTCCTTTCTGGCCACT
RPr123	rat	ATGACCACTGGGACCACACT
POMC5	mouse	TCTGTGCTAACGCCAGCCTC
POMC3	mouse	TGAGCCTTGACGTGACCTTC
FSHb5	mouse	CTGCTCTGTGGCATTAGAC
FSHb3	mouse	CTGGGGAAAGCTGAACACTGA
mHPRTprom5	mouse	CCTCCGGGGACGGAGCCT
mHPRTprom3	mouse	CGACGCTGGGACTGCGGGTCGGCAT
RHPRT5	rat	CCAACCTGTCAGAACAGAGTC
RHPRT3	rat	CAGTGAGGTAAGTCCAACGCT
MS ChIP 1F	mouse	GCTAACCTGTGACGTTTCCA
MS ChIP 1R	mouse	TTGGGTCCTGCTCAAGAGAT

2.7.2 La PCR en temps réel

Les PCR en temps réel ont été effectuées en utilisant l'input (1%) et les ADN purifiés. Les ratios ont été calculés en appliquant le calcul suivant $R (\%_{input}) = 2^{((Cp_{input} - Cp_{éluat}) \times 1/2 \text{ efficacités})}$, à la norme de courbe efficacités tirées pour chaque paire d'amorces obtenues à partir de LightCycler 480 logiciels (Roche Diagnostics).

2.7.3 Détermination des intensités de fluorescence

2.7.3.1 Par PCR semi-quantitative

(Figure 16a/b ; 17a/b ; 18a/b ; 19a/b ; 20a/b ; 21a/b ; 22a/b ; 23a/b)

L'intensité de fluorescence des fragments d'ADN obtenue par PCR semi-quantitative a été mesurée à l'aide du logiciel Image J, développé par le National Institute of Health. Le rapport de l'intensité de l'apport (Input) total (I_{max}) sur l'intensité du contrôle négatif (I_{c0}) fournit une première estimation permettant d'apprécier la qualité des PCR et des immunoprécipitations. Pour chaque gène et dans chaque lignée, la quantité du fragment amplifié après immunoprécipitation (Q_{IP}) est exprimée en fonction d' I_{max} en pourcentage selon la formule suivante où I_{IP} est l'intensité de fluorescence du fragment amplifié :

$$Q_{IP} = ((I_{IP} - I_{c\hat{o}}) / (I_{max} - I_{c\hat{o}})) \times 100$$

Ces mesures ont été comparées aux résultats obtenus par PCR en temps réel sur les mêmes chromatines.

2.7.3.2 *Par PCR quantitative en temps réel*

(Figure 16c ; 17c ; 18c ; 19c ; 20c ; 21c ; 22c ; 23c)

Les amorces utilisées s'hybrident à proximité du site d'initiation de la transcription des gènes. Les "cycles de sortie" (C_p) de chaque ADN immunoprécipité (C_{pIP}) et de l'apport total (C_{pmax} ; 100%) sont utilisés pour déterminer la fraction d'ADN total immunoprécipité en appliquant la formule :

$$\% \text{ Apport total} = 2^{((C_{pmax} - C_{pIP}) \times (1/2 \text{ efficacité}))}$$

2.8 Extraction d'ADN génomique

Les ADN génomiques des cellules en culture α T3-1, L β T2, GT1-7, PC12, GH3B6 et AtT20 sont extraits afin d'étudier l'état de méthylation. Après avoir été décollées par digestion à la trypsine (Sigma), les cellules sont transférées dans des tubes de 2 ml et sont incubées à 65°C pendant 5 h dans 500 μ l de tampon de lyse [100 mM Tris(HCl) pH8.5 ; 5 mM EDTA ; 0,2% SDS ; 200 mM NaCl ; 100 μ g/ml Protéinase K ; dans de l'H₂O]. Après les 5 heures d'incubation, une extraction au phénol/chloroforme est effectuée. 500 μ l de phénol et 500 μ l de chloroforme sont ajoutés dans chaque tube. Une fois bien mélangés, les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes, à 15°C à 12000 rpm. Les phases supérieures sont récupérées délicatement et mises dans des tubes propres. 500 μ l de chloroforme sont ajoutés à la phase récupérée. Les tubes sont mélangés puis centrifugés pendant 10 minutes à 15°C à 12000 rpm. Les phases supérieures sont récupérées et transférées dans des tubes propres. Afin de précipiter les pelotes d'ADN, 25 μ l de NaAC 3M/5M et 500 μ l d'EtOH 100% sont adjoints aux phases supérieures récupérées. Les tubes sont agités et les pelotes d'ADN deviennent visibles en se condensant. Elles sont prélevées, séchées à température ambiante dans des tubes

propres ouverts. Lorsque l'EtOH s'est évaporé, l'ADN est repris dans 50 µl d'H₂O pure puis dosé au Nanodrop.

[C] _{αT3-1} = 2.318 µg/µl	[C] _{AtT20} = 1.76 µg/µl
[C] _{GH3B6} = 2.63 µg/µl	[C] _{GT1-7} = 0.858 µg/µl
[C] _{LβT2} = 3.615 µg/µl	[C] _{PC12} = 1.74 µg/µl

2.9 Immunohistologie

Les solutions à préparer sont :

- 1X PBS + 1% BSA. Pour 100 ml, déposer 1g de poudre BSA en surface et laisser décanter sans intervenir. Homogénéiser par retournements lents (ou préparer de la BSA 10%, aliquoter et stocker à -20°C).
- 1X PBS + 1% BSA + Triton X-100 0,25%. Dans 10ml de la solution précédente, diluer (sans agiter) 25 µl de Triton X-100.
- 1X PBS + 0,25% Tween20. Dans 100 ml de 1X PBS, diluer (sans agiter) 250 µl de Tween20.

Les échantillons de tissus hypophysaires d'embryons de souris à E13.5 et de souris adultes de 3 semaines sont prélevés. Les hypophyses sont fixées au paraformaldéhyde (PAF) à 2% dans 1X PBS pendant 2h à 4°C, puis sont lavées au 1X PBS 3 fois 30 minutes à 4°C. Les tissus sont ensuite cryocongelés dans du PBS-sucrose 18% toute une nuit puis lavés au 1X PBS 3 fois 30 minutes à 4°C.

Les hypophyses sont coupées au cryostat, à 7µm d'épaisseur et les coupes sont disposées sur des lames de microscopes puis chauffées afin que la fixation des coupes sur les lames se fasse correctement.

Une zone de 1cm² environ a été délimitée au Dakopen sur les lames après les avoir chauffées 1h et fixées 10 minutes au méthanol à -20°C. La saturation des sites non spécifiques se réalise dans (1X PBS, 1% BSA, 0,25% Triton X-100, SVF) 1 heure à température ambiante. Les incubations avec les anticorps primaires anti-Islet1 (souris), utilisé au 1/25^{ème} et

anti-FOXL2 (lapin), utilisé au $1/300^{\text{ème}}$ se font pendant la nuit à 4°C. Les anticorps sont dilués dans une solution de (1X PBS + 1% BSA + 0,25% Triton X-100). Les coupes sont lavées dans un borel 3 fois 10 minutes à température ambiante, dans une solution de 1X PBS + 0,25% Tween20. Les lames sont incubées 1h à température ambiante avec les anticorps secondaires anti-souris Alexa rouge dilué au $1/500^{\text{ème}}$ pour ISL1 et anti-lapin Alexa vert dilué au $1/500^{\text{ème}}$ pour FOXL2. Les coupes sont lavées dans un borel 3 fois 10 minutes à température ambiante, dans une solution de 1X PBS + 0,25% Tween20. Les coupes sont ensuite incubées la nuit à 4°C avec les anticorps primaires anti-TSH β (cobaye) utilisé au $1/500^{\text{ème}}$, anti-LH β (lapin) utilisé au $1/300^{\text{ème}}$ et anti-LH β (souris) utilisé au $1/300^{\text{ème}}$. Les anticorps sont dilués dans une solution de 1X PBS + 1% BSA + 0,25% Triton X-100 Les coupes sont lavées dans un borel 3 fois 10 minutes à température ambiante, dans une solution de 1X PBS + 0,25% Tween20. Les lames sont ensuite incubées pendant 1h à température ambiante avec les anticorps secondaires anti-souris Alexa rouge, anti-lapin Alexa vert et anti-cobaye Alexa vert. Ils sont dilués au $1/500^{\text{ème}}$ dans du 1X PBS + 0,25% Triton X-100. Les coupes sont lavées dans du 1X PBS et incubées en présence de DAPI pendant 5 min puis rincées. Les lames sont montées avec du cytifluor puis observées au microscope.

3 Résultats

De nombreux exemples illustrent la diversité des sites d'initiation de la transcription pour un même gène au sein de différents tissus. Cette diversité a souvent pour origine l'existence de promoteurs alternatifs et donc d'éléments régulateurs différents. Pour isoler et analyser un promoteur, il est donc impératif de connaître le site d'initiation de la transcription dans les tissus d'intérêt, ici les cellules gonadotropes. Ces sites d'initiation en effet définissent quel promoteur est utilisé dans tel ou tel tissu.

L'identification du site d'initiation de la transcription d'*Isl1* dans le contexte gonadotrope était un préalable nécessaire pour réaliser les constructions comportant le promoteur d'*Isl1* ou des fragments de ce promoteur associés au gène rapporteur luciférase.

3.1 Détermination du site d'initiation de la transcription du gène *Isl1*

Transcription réverse	Amorce 3'	Oligo(dT)
	5'RACE CDS primer	
	BD Smart II A oligonucleotide	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTA CGCGGG
Amplification	5'universal primer (long)	CTAATACGACTCACTATAGGGC AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
	5'universal primer (short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC
	Amorce 31	ACAGATATGGGAGACATG
	Amorce 32	AGCTGTACGTGCTTTGTTAGG
	Amorce 33	AGTCAGCATAGGCTTCAGCAAG
Amplification "Nested"	Nested universal primer A (NUP)	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT

Pour déterminer la position du site d'initiation de transcription du gène *Isl1* dans les cellules gonadotropes, nous avons mis en œuvre la technologie 5'RACE (Rapid amplification

of cDNA ends). A cette fin, nous avons utilisé un kit commercial de chez Clontech qui met à profit l'activité terminale transférase des transcriptases reverse du MMLV. Outre leur activité transcriptase reverse, ces enzymes ajoutent à l'extrémité 3' de l'ADN simple brin transcrit trois à cinq dC. Ainsi, l'une des amorces 5' fournie dans ce kit commercial comporte une séquence spécifique se terminant à son extrémité 3' par un poly dG suffisant pour permettre l'hybridation avec l'extrémité poly(dC) des brins reverse néosynthétisés *in vitro*.

Les cDNA ont été obtenus à partir d'ARN totaux extraits et purifiés de cellules α T3-1, reverse transcrits en utilisant l'amorce 5'RACE CDS du kit contenant essentiellement un oligo(dT) permettant l'initiation de la synthèse reverse du premier brin à partir de la séquence poly(A) des ARNm. L'amorce 5' ci-dessus décrite est incluse dans la réaction, s'hybride aux extrémités poly(dC) des ADNs simple brin synthétisés et relance la transcription reverse, permettant ainsi l'inclusion d'une séquence spécifique "BD Smart" à l'extrémité 3' des premiers brins synthétisés. L'amplification est ensuite réalisée avec un mélange de deux amorces 5', longue et courte, et, dans 3 réactions séparées avec 3 différentes amorces 3' spécifiques du gène *Isl1*, la première recouvrant le codon ATG (amorce 31), la seconde s'hybridant dans l'exon 2 (amorce 32) et la troisième dans l'exon 3 (amorce 33). Une seconde réaction de PCR "semi-nested" a été le plus souvent effectuée en utilisant l'amorce NUP pour obtenir le produit final d'amplification. Les produits ont été déposés et analysés sur gel d'agarose. Seule l'amplification avec l'amorce 32 (**Figure 8**) a engendré un produit de PCR compatible avec la position présumée du site d'initiation d'*Isl1*. Les autres réactions ont soit échoué soit généré des produits de taille trop courte, finissant dans la séquence codante du gène, suggérant une dégradation des ARNm ou une réaction de reverse transcription avortée. La bande Nup/32 obtenue a été ensuite extraite et intégrée dans le plasmide pGEM®-T Easy. Après ligation dans le vecteur et transformation dans les cellules compétentes E. Coli DH5 α , les clones recombinants ont été criblés par PCR (**Figure 8**) et l'ADN plasmidique des clones positifs isolé et purifié. Le séquençage a permis de confirmer que le site d'initiation de transcription du gène *Isl1* dans les cellules gonadotropes est identique à celui décrit dans Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). Il se situe à 266 pb en amont de l'ATG.

Les études *in silico* (**Figure 9**) du promoteur du gène réalisées avec le logiciel en ligne "CpG plot" (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/>) ont permis de mettre en lumière la présence d'un îlot CpG d'une longueur de 572 pb (-423 pb à +147 pb) qui recouvre le site

d'initiation de transcription (CpG ratio observé/attendu $> 0,60$; %G+%C > 50 ; longueur > 200 pb). Cet îlot CpG se situe donc dans une position tout à fait traditionnelle chez les gènes à îlot CpG, autour du site d'initiation de la transcription. Ces gènes à îlot CpG appartiennent classiquement à la catégorie des gènes de ménage (housekeeping genes), gènes d'expression ubiquiste. Cette classification est quelque peu remise en cause. En effet, on estime désormais que 70% des gènes présentent cette structure. L'appartenance d'*Isl1* à cette classe n'en fait pas un gène d'expression ubiquiste comme nous pourrions le constater au sein des différentes lignées hypophysaires et non hypophysaires que nous avons analysées.

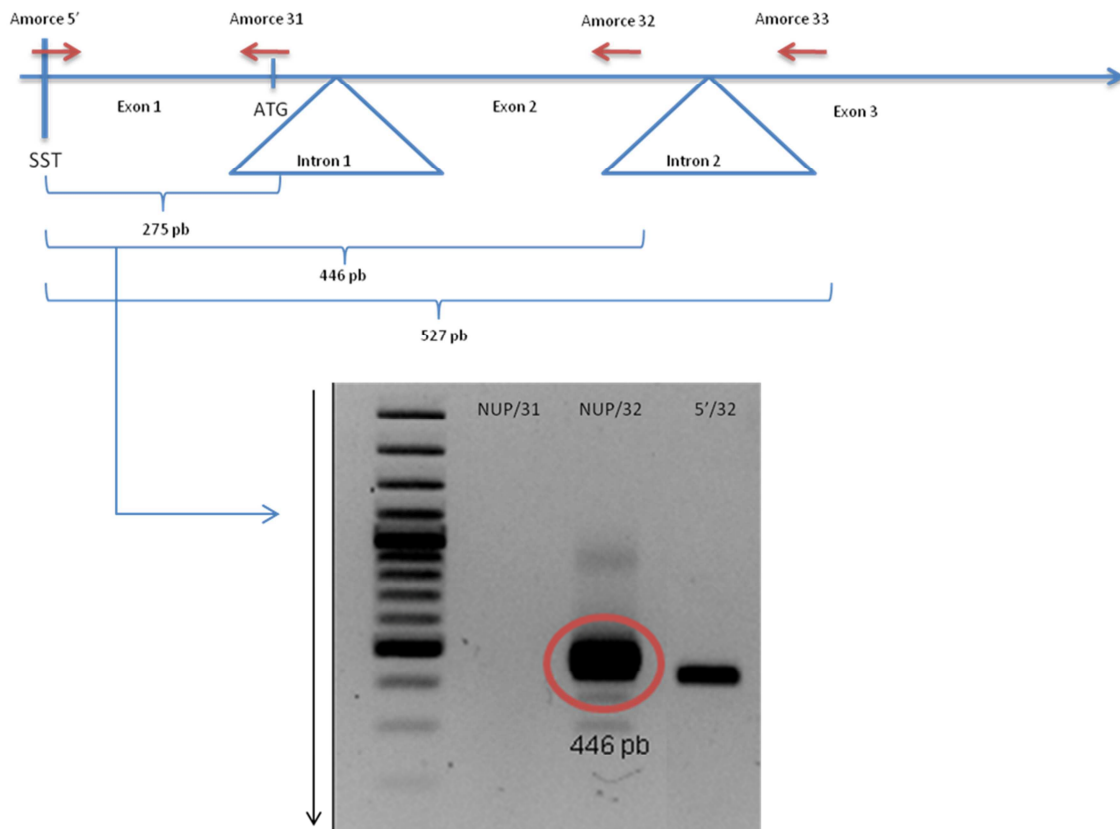


Figure 8
Détermination du site d'initiation de la transcription du gène *IsII*

Le site d'initiation de transcription du gène *IsII* murin se trouve au sein du premier exon. Il est à 275 pb en amont de l'ATG. Les amorces utilisées pour la détermination du SST sont l'amorce 5', au niveau du site d'initiation de transcription présumé, et trois amorces antisens : l'amorce 31 au niveau de l'ATG, l'amorce 32 se trouvant à la fin du deuxième exon et l'amorce 33 au début du troisième exon.

Les cDNA obtenus à partir d'ARN totaux extraits et purifiés de cellules gonadotropes α T3-1 ont été amplifiés par PCR. Le fragment de 446 pb compris entre les amorces 5' et 32 a été utilisé pour déterminer la position du site d'initiation de transcription par séquençage.

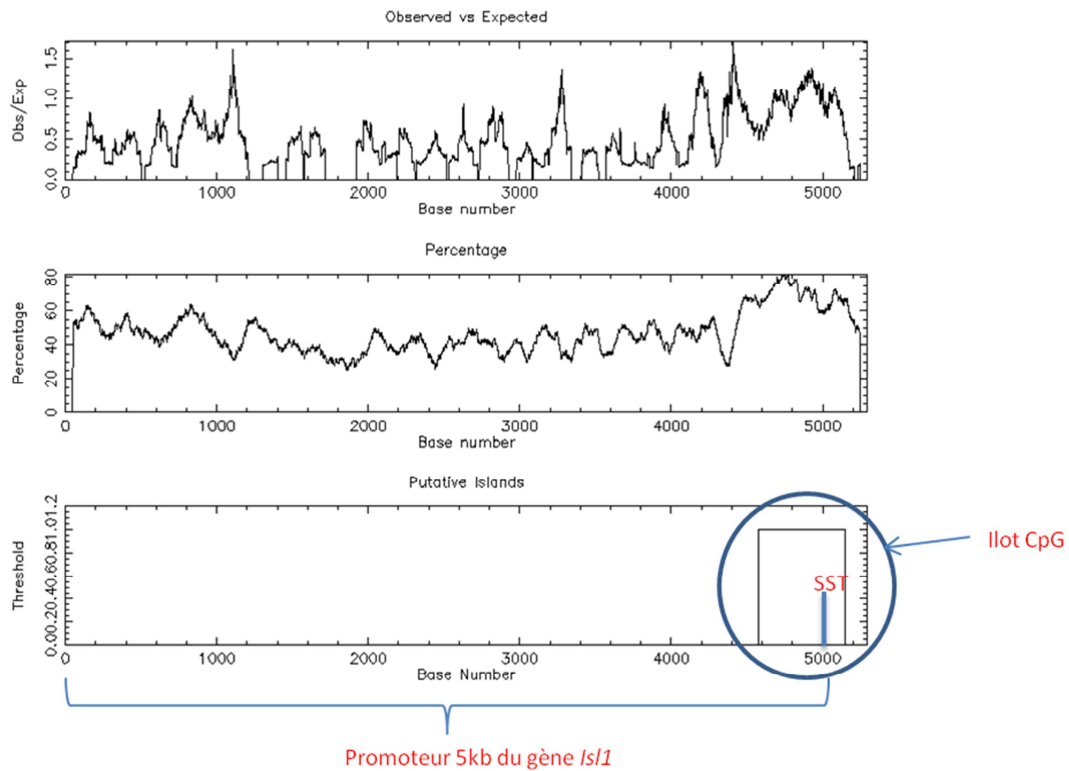


Figure 9
Ilot CpG au niveau du promoteur du gène *ISL1* humain

Les études *in silico* de la séquence du promoteur du gène *ISL1* sur Ensembl avec le logiciel « CpG plot » ont permis de mettre en évidence un îlot CpG de longueur de 572 pb recouvrant le site d'initiation de transcription.

(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000016082;r=5:50678921-50690564 ;
<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/>)

3.2 Etude de l'activité du promoteur.

Avec pour objectif de définir la capacité du promoteur du gène *Isl1* à diriger spécifiquement ou non l'expression du gène rapporteur dans la lignée hypophysaire α T3-1 et L β T2, nous avons obtenu de Sylvia M. Evans le promoteur d'*Isl1* déjà inséré dans le plasmide pGL3 basic (Promega). Ce promoteur comporte -4674 pb en 5' et +222 pb en 3' du site d'initiation de la transcription en amont du gène Luciférase *Firefly* (Lin et al, 2007).

Par ailleurs, différentes constructions présentant des délétions dans le promoteur ont été effectuées en mettant à profit les sites de reconnaissance pour des enzymes de restriction présents exclusivement dans la partie promotrice insérée dans le plasmide (cf. Matériels et méthodes).

L'étude de l'expression du gène *Isl1* a tout d'abord été réalisée par transfection transitoire sur les lignées cellulaires hypophysaires L β T2 et α T3-1, la lignée neuronale PC12, la lignée lactotrope GH3B6, la lignée corticotrope AtT20, la lignée hypothalamique GT1-7 et une lignée contrôle de cellules de hamster chinois, les CHO.

3.2.1 Activité ubiquiste du promoteur d'*Isl1* dans différentes lignées cellulaires

Les expériences de transfections transitoires ont été effectuées sur les lignées cellulaires en utilisant les vecteurs luciférase comprenant soit le promoteur de 1.1 kb du *Gnrhr*, soit le promoteur de 5 kb d'*Isl1*. La construction comportant le promoteur du *Gnrhr* est utilisée ici comme un promoteur de référence capable de diriger spécifiquement l'expression du gène rapporteur dans les cellules gonadotropes. Le promoteur minimal du gène de la prolactine comporte les 35 pb de part et d'autre du site d'initiation de la transcription, notamment la boîte TATA. Il présente une activité minimale dans les cellules gonadotropes. Il constitue un contrôle négatif. L'activité luciférase a été mesurée 40 heures après la transfection. Les résultats sont présentés sur la **Figure 10**.

D'un point de vue général, l'activité du promoteur de 5 kb d'*Isl1* est élevée et plus importante que celle du promoteur du *Gnrhr* quelle que soient les lignées comparées. Comme attendu, celui-ci ne s'avère actif que dans les deux lignées gonadotropes L β T2 et α T3-1. Par ailleurs, l'activité du promoteur d'*Isl1* est moins importante dans les cellules GH3B6 et L β T2

comparée aux cellules α T3-1, AtT20, GT1-7 et CHO. Ces résultats suggèrent plusieurs hypothèses : 1 - l'expression d'*Isl1* est ubiquiste, 2 - l'ensemble des éléments présents dans les 5 kb du promoteur sont insuffisants pour conférer une expression cellulaire spécifique, 3 - d'autres mécanismes, notamment de type épigénétique (modifications de l'ADN et/ou des histones), sont impliqués. Ces modifications épigénétiques par définition n'affectent pas les vecteurs en transfection transitoire.

Pour confirmer ces données, nous avons testé plusieurs constructions présentant des promoteurs portant différentes délétions. De plus, des études de ChIP-on-Chip réalisées dans le cadre d'un autre projet du laboratoire portant sur le facteur forkhead FOXL2 nous ont conduits à tester l'implication éventuelle de ce facteur dans l'activité du promoteur d'*Isl1* (résultats non publiés). Dans ces approches de ChIP-on-Chip, la chromatine isolée de cellules gonadotropes α T3-1 avait été immunoprécipitée par l'anticorps anti-FOXL2 puis analysée sur puce de promoteurs, révélant le promoteur d'*Isl1* comme l'une des cibles principales de ce facteur de transcription. D'après ces analyses, FOXL2 se lie au sein d'une région s'étendant de -2270 pb à -985 pb qui présente des motifs spécifiques 5'-CTCAAGTCA-3' à -2034 pb et 5'-AGCTTGAC-3' à -1841 pb susceptibles effectivement d'interagir avec FOXL2. En parallèle des approches par transfection transitoire, nous avons vérifié la présence *in vivo* de FOXL2 dans les cellules gonadotropes hypophysaires.

3.2.2 Etude par immunohistochimie de la localisation de FOXL2 dans l'hypophyse.

Des expériences d'immunohistochimie réalisées sur des hypophyses adultes de souris de trois semaines ont permis de vérifier la localisation de FOXL2 dans les cellules gonadotropes et thyroïdotropes. A cette fin, l'anticorps anti-FOXL2 dilué au 1/300^{ème}, l'anticorps anti-TSH β au 1/500^{ème} et l'anticorps anti-LH β au 1/500^{ème} ont été successivement ou en parallèle appliqués sur des coupes d'hypophyse. Les résultats montrent une co-localisation entre FOXL2 et LH β et entre FOXL2 et TSH β . Par ailleurs, la posthypophyse est totalement négative (**Figure 11a/b/c**).

3.2.3 Étude du promoteur du gène *Isl1* par « délétion » de différents fragments en présence ou en absence de FOXL2

Les constructions luciférase comportant le promoteur d'*Isl1* affectés de différentes délétions ont été co-transfectées avec les vecteurs d'expression de FOXL2, d'ISL1 ou le pcDNA3 (vecteur contrôle vide) dans les cellules gonadotropes α T3-1. Les résultats obtenus montrent qu'aucun des deux vecteurs d'expression testés, seul ou en combinaison, n'affecte l'activité du promoteur d'*Isl1*, quelle que soit la délétion testée. Par contre, ces différentes délétions modulent l'activité du promoteur, suggérant l'existence d'éléments répresseurs. L'activité du promoteur de 5 kb est en effet clairement inférieure à celle du promoteur de 540 pb. Ces résultats n'excluent pas que FOXL2 (ou ISL1) participe à la régulation de la transcription et au maintien de l'expression du gène *Isl1* par liaison spécifique sur son promoteur en coopérant avec d'autres facteurs non identifiés qui seraient indispensables à la fonctionnalité de FOXL2. Les résultats sont représentés sur la **Figure 12**.

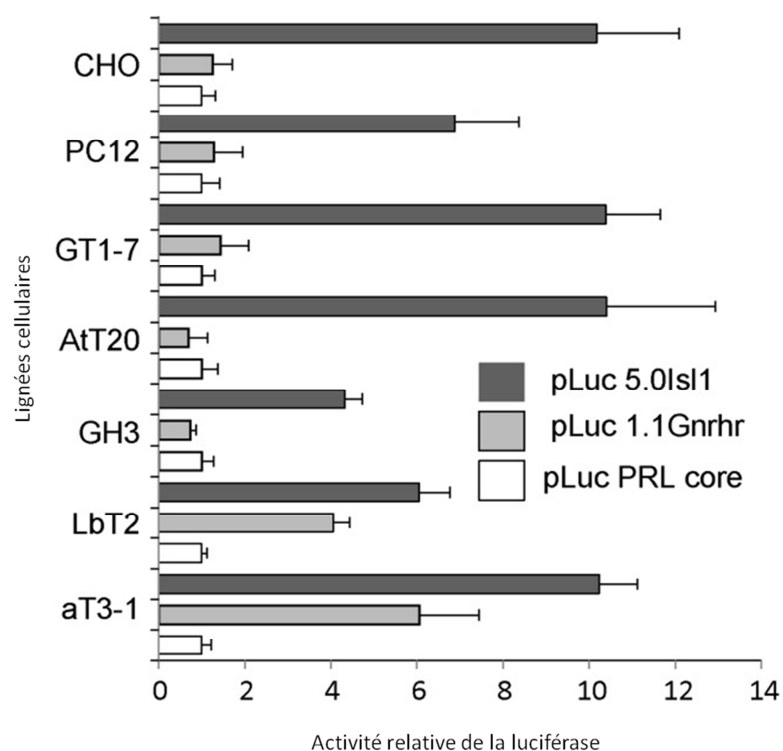


Figure 10
Activité ubiquiste du promoteur d'*Isl1* dans différentes lignées cellulaires

Des plasmides contenant les promoteurs de 5 kb d'*Isl1* et 1,1 kb du *Gnrhr* ont été transfectés transitoirement dans les cellules des lignées hypophysaires (α T3-1, L β T2, GH3B6, AtT20), hypothalamiques (GT1-7), neurales (PC12) et ovariennes (CHO) en culture. L'activité relative de la luciférase a été mesurée 40h après transfection dans chaque lignée.

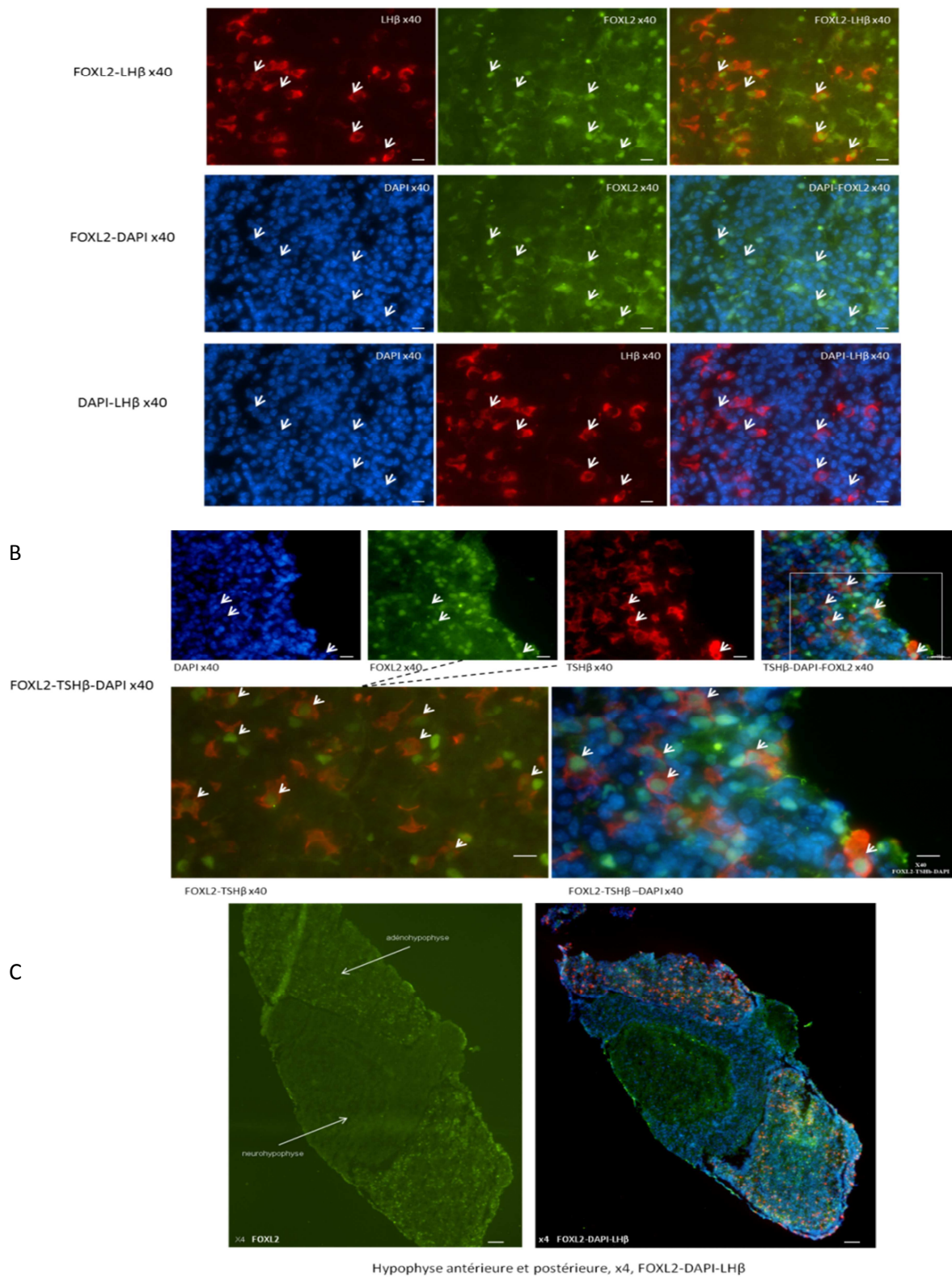


Figure 11
Etude par immunohistochimie de la localisation nucléaire de FOXL2 dans l'adénohypophyse.

A : colocalisation de FOXL2 (en vert), de LH β (en rouge) et du DAPI (en bleu).

B : colocalisation de FOXL2 (en vert), de TSH β (en rouge) et du DAPI (en bleu).

C : adénohypophyse et posthypophyse de souris âgée de trois semaines : FOXL2 en vert est localisé spécifiquement dans l'adénohypophyse et colocalisé avec LH β . 177

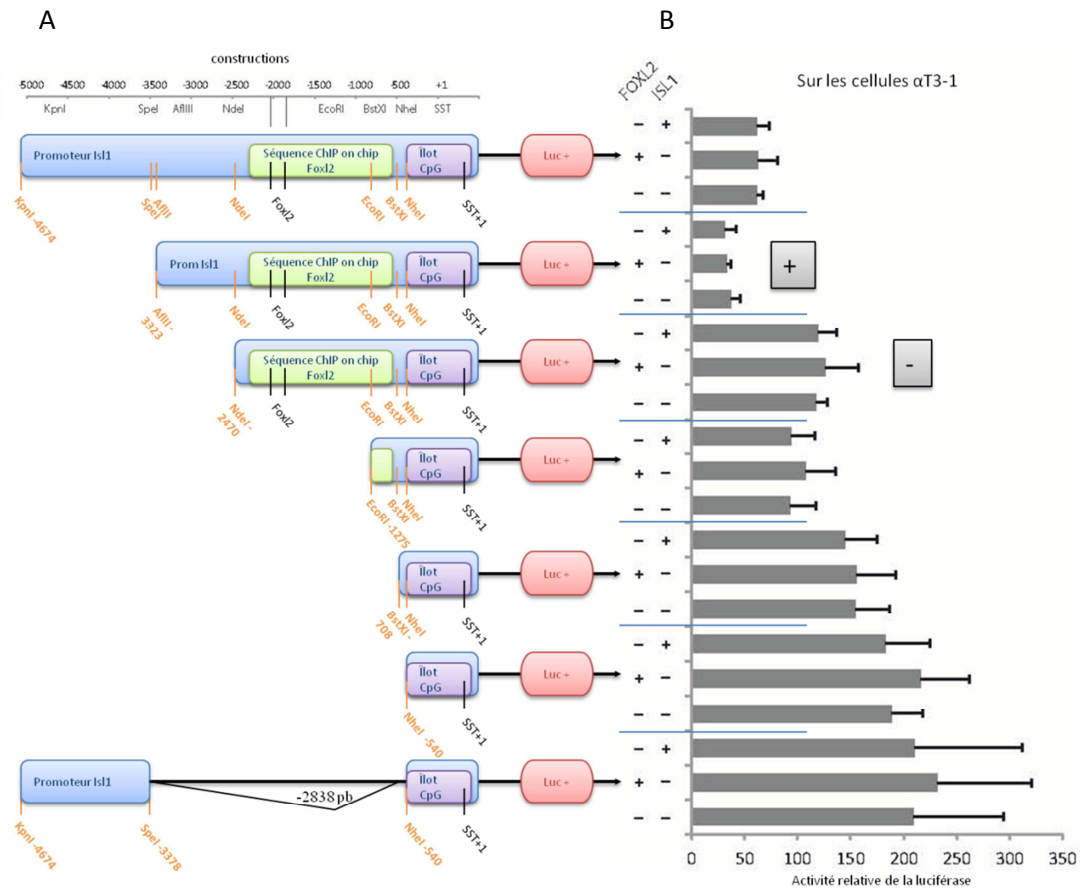


Figure 12
Étude du promoteur du gène *Isl1* par « délétion » de différents fragments en présence ou en absence de FOXL2 dans les cellules gonadotropes α T3-1.

A : la séquence promotrice de 5 kb en amont du SST d'*Isl1* a été utilisée pour réaliser différentes constructions. Cette séquence a été digérée par plusieurs enzymes de restriction (indiquées en orange : KpnI, SpeI, AflIII, NdeI, EcoRI, BstXI et NheI). Ces constructions furent intégrées dans un plasmide pGL3-basic (Promega) puis transfectées transitoirement dans les cellules gonadotropes α T3-1 en culture. Les différentes couleurs permettent de distinguer en bleu le promoteur d'*Isl1*, en vert la région mise en évidence par ChIP-on-chip dans laquelle se trouvent les motifs potentiels de liaison de Foxl2 (spécifiés par deux barres en noir), en violet l'ilot CpG de 572 pb à cheval sur le site d'initiation de transcription (SST+1), en rose la séquence codant la luciférase Firefly (Luc +).

B : Résultats de la transfection transitoires. L'activité luciférase a été mesurée 40h après co-transfection en présence ou non de FOXL2 et d'ISL1.

3.3 Analyse de l'expression du gène endogène codant ISL1

Pour déterminer si le gène endogène codant ISL1 était exprimé de manière constitutive dans ces différentes lignées, nous avons mesuré les ARNm d'ISL1 par PCR quantitative (**Figure 13a**). S'ajoutent aux lignées testées en transfection transitoire, les lignées gonadique mLTC1 et rétinienne RGC5. Deux gènes de référence ont été utilisés : ceux de la cyclophilline et de l'hypoxanthine phosphoribosyltransférase (HPRT). Les résultats sont exprimés en calculant les moyennes des Cp normalisés, c'est-à-dire les Cp de sortie d'*Isl1* divisés par les Cp de sortie des gènes de référence, cyclophilline et HPRT. Concernant les cellules GH3, l'HPRT n'est pas un bon gène de référence puisque ces cellules ne l'expriment pas ou très peu (la moyenne des Cp est égale à 28.5 cycles dans les GH3 comparé à 23 cycles dans les autres lignées) en accord avec les données de la littérature (Melmed, 1982). Par contre, les Cp de sortie de la cyclophilline sont beaucoup plus homogènes, en moyenne à 18-19 cycles. L'HPRT ne constitue pas dans ces expériences une référence adéquate. En revanche, le gène de la cyclophilline affiche un profil d'expression homogène et constitue donc une bonne référence. Si l'on compare les résultats rapportés à la cyclophilline, *Isl1* est fortement exprimé dans les cellules L β T2 et les GT1-7, plus faiblement dans les lignées α T3-1 et PC12. Dans les lignées GH3B6 et RGC5, *Isl1* est peu exprimé et il est indétectable dans les lignées AtT20 et mLTC1. Il y a donc une forte inadéquation entre les résultats obtenus par transfection transitoire traduisant une activité ubiquiste du promoteur d'*Isl1* et ceux obtenus par quantification des ARNm illustrant une expression plutôt spécifique du tissu, notamment au niveau hypophysaire : ISL1 étant absent dans les cellules de type corticotrope (AtT20), faiblement exprimé dans les cellules lacto-somatotropes et plus fortement exprimé dans les cellules gonadotropes (α T3-1), notamment les plus différenciées (L β T2). Ces données contrastent avec celles obtenues avec le gène du *Gnrhr* (**Figure 13b**). En effet, les niveaux d'ARNm du *Gnrhr* ne sont détectables que dans les cellules gonadotropes α T3-1 et L β T2, en adéquation avec les résultats de transfection transitoire.

Pour confirmer ces résultats, les extraits nucléaires des lignées α T3-1, AtT20, GH3B6, GT1-7, L β T2 et PC12 ont été isolés et analysés par western blot (**Figure 14**) en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre ISL1 (anti-*Isl1* 39-4D5). Cet anticorps est produit par un hybridome sécréteur cultivé au laboratoire et obtenu auprès du Developmental Studies Hybridoma Tissue Bank (National Institute of Child Health and Human Development,

University of Iowa, Department of Biological Sciences). Ces données confirment partiellement les résultats obtenus par PCR quantitative. L'anticorps révèle dans cette expérience plusieurs espèces immunoréactives dont deux au moins pourraient correspondre aux isoformes d'ISL1, ISL1 α et ISL1 β (Ando et al, 2003). La forme alpha de 39 K est la plus abondante. Nous pouvons remarquer l'absence de bande dans les extraits obtenus à partir des lignées cellulaires AtT20 et GH3B6 qui constituent donc de bons témoins négatifs, en accord avec les données obtenues par PCR quantitative. A partir des extraits provenant des autres lignées GT1-7, α T3-1, L β T2 et PC12, l'anticorps anti-ISL1 révèle les deux espèces moléculaires susceptibles de correspondre aux deux isoformes d'ISL1. Si ces résultats sont globalement cohérents avec ceux obtenus par PCR quantitative, ils diffèrent néanmoins par les niveaux relatifs de protéines (western blot) et d'ARNm (PCR) détectés. Outre des régulations post-traductionnelles, notamment des taux de dégradation différentielle dans les différentes lignées, la localisation intracellulaire des ARNm, majoritairement localisés dans le cytoplasme, et celle des protéines, essentiellement nucléaires, pourraient expliquer ces divergences.

La confrontation des résultats des expériences de transfections transitoires avec celle de mesure des ARNm par PCR quantitative et des protéines par western blot permet déjà d'éliminer l'hypothèse d'une expression ubiquiste d'ISL1, notamment dans les lignées hypophysaires testées. L'hypothèse d'éléments régulateurs localisés à l'extérieur du promoteur de 5 kb fait l'objet d'un projet à part compte tenu de l'ampleur des technologies à mettre en œuvre, notamment la transgénèse transitoire et la mise au point de lignées gonadotropes α T3-1 et L β T2 capable d'intégrer dans un site unique du génome murin le gène complet d'ISL1 associé à un gène rapporteur luciférase. Nous nous sommes donc plus particulièrement intéressés aux modifications épigénétiques.

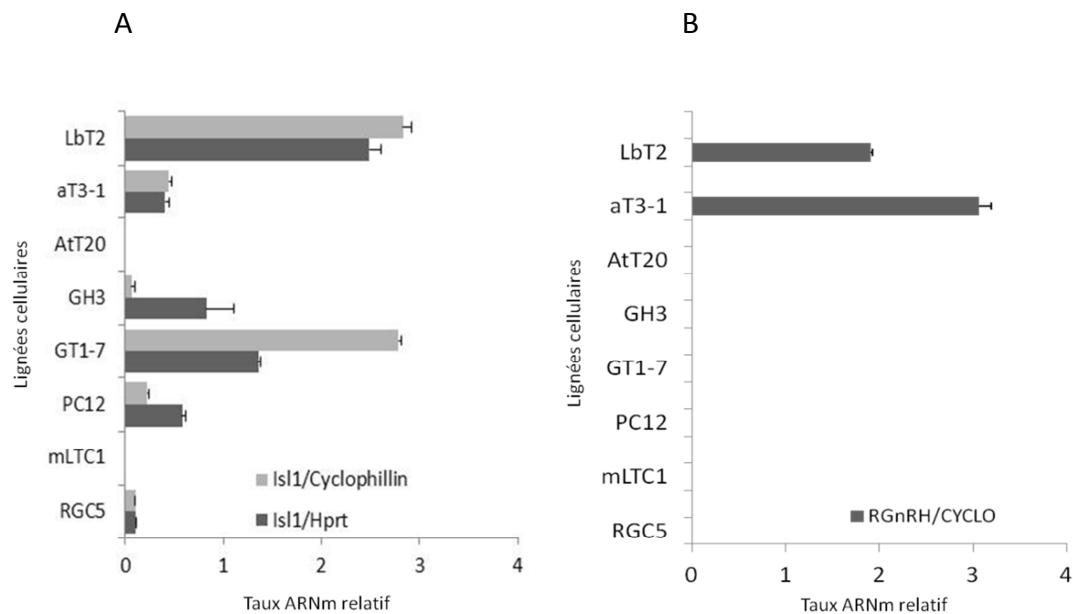
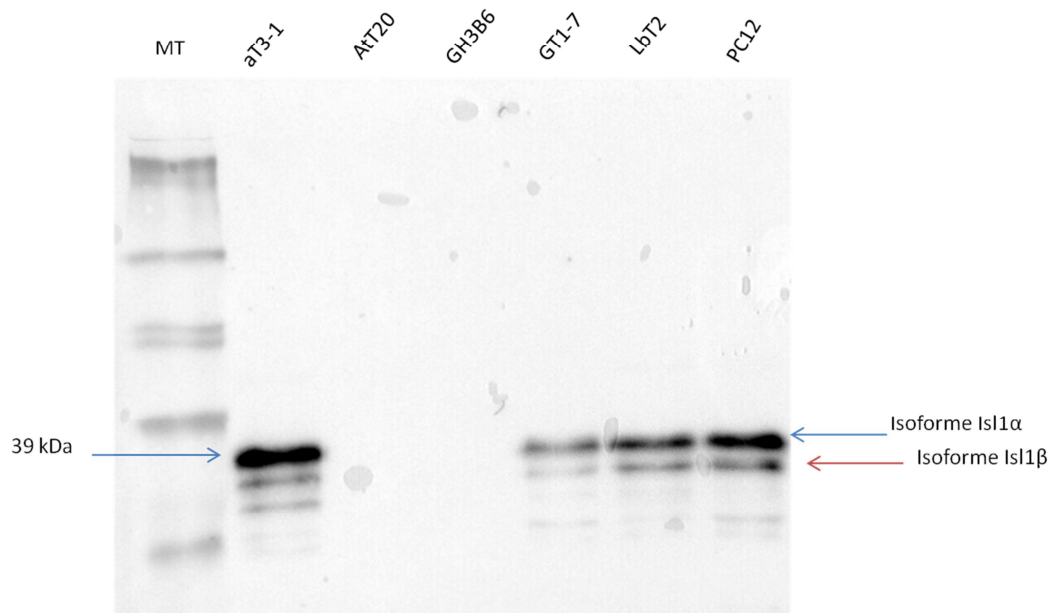


Figure 13
Analyse de l'expression du gène endogène codant la protéine ISL1 et GnRHR par qPCR en temps réel.

Mesures du taux d'ARNm relatif codé par *Isl1* (A) et par *Gnrhr* (B) dans les lignées hypophysaires α T3-1, LbT2, GH3B6 et AtT20, dans la lignée hypothalamique GT1-7, dans la lignée neuronale PC12, dans la lignée gonadique mLTC1 et dans la lignée rétinienne RGC5. Ces mesures ont été normalisées : pour *Isl1* (A) par rapport à la cyclophiline (en gris) et à l'*Hprt* (en noir) et pour *Gnrhr* (B) par rapport à la cyclophiline



Anticorps anti-isl1 39-4D5, exposition 15 secondes.
Extraits nucléaires des lignées α T3-1, AtT20, GH3B6, GT1-7, L β T2 et PC12

Figure 14 Étude par Western blot de la protéine ISL1 dans les lignées cellulaires

Des extraits nucléaires des lignées hypophysaires α T3-1, L β T2, GH3B6 et AtT20, de la lignée hypothalamique GT1-7 et de la lignée neuronale PC12 ont été analysés par western blot en utilisant l'anticorps anti-Is11 39-4D5. Après une exposition de 15 secondes, une bande dominante correspondant à l'isoforme Isl1 α de poids 39 kDa et une bande plus faible correspondant à l'isoforme Isl1 β sont révélées dans les cellules des lignées hypophysaires α T3-1 et L β T2 ainsi que dans les cellules de la lignée hypothalamique GT1-7 et de la lignée neuronale PC12. En revanche, ces deux bandes ne sont pas détectées dans les cellules des lignées hypophysaires GH3B6 et AtT20.

3.4 Modifications épigénétiques d'*Isl1* dans les différentes lignées hypophysaires

L'inactivation ou l'activation de la transcription d'*Isl1* pourrait s'expliquer par une régulation épigénétique des histones et de l'ADN. Pour évaluer l'impact de ces éventuelles modifications, nous avons choisi de les comparer à celles observées sur les gènes marqueurs du lignage gonadotrope comme le *Gnrhr*, la *Lhb*, et la *Fshb*, des lignages gonadotrope et thyrotrope comme la *Cga* et enfin des lignages lactotrope et corticotrope, respectivement la *Prl* et la *Pomc*. De plus, nous avons aussi analysé un gène d'expression ubiquiste, *Hprt*. Dans un premier temps, nous avons analysé et comparé la structure de ces différents promoteurs notamment leur richesse relative en G et C et l'abondance des sites potentiels de méthylation, les dinucléotides CpG.

3.4.1 Etudes comparées des promoteurs

Dans le cadre de cette étude, nous avons en premier lieu réalisé l'étude comparée de la structure des différents promoteurs des gènes à analyser : *Isl1*, *Gnrhr*, *Lhb*, *Fshb*, *Hprt* et *Cga*, dans cinq lignées cellulaires : α T3-1, L β T2, GH3B6, GT1-7 et AtT20. L'étude des gènes *Prl* et *Pomc* a été circonscrite aux lignées GH3B6 et AtT20 (**Figure 15**).

Ces promoteurs se classent en deux grands groupes : les promoteurs riches en G et C, et ceux riches en T et A. Les promoteurs d'*Isl1*, de *Hprt* et de *Lhb* appartiennent à la première classe avec des pourcentages respectifs de 53,1%, 52,1% et 53,6% de G et C (**Figure 15a**). Ce pourcentage élevé de G et C dans le promoteur de *Lhb* est inattendu et pourrait s'expliquer par la forte pression de sélection s'exerçant sur cette partie du gène qui, dans les gonades, est en grande partie codante (Zhang et al, 1995). Par ailleurs, l'ilot CpG de *Hprt* a été pris en compte soit 1000 pb environ en aval du site d'initiation de la transcription. Les gènes *Gnrhr*, *Fshb*, *Cga* et *Prl* ont des taux de T et A majoritaires, respectivement 62,5%, 61,7%, 59,1% et 61,3%. Enfin, le promoteur de la *Pomc* s'avère équilibré avec un pourcentage quasi équivalent de chacune des bases (49,3 et 50,7%). Nous avons également dénombré le nombre de sites potentiels de méthylation, les CpG, et comparé cette fréquence à celle attendue d'après la composition en bases de la séquence elle-même ($[f(C) \times f(G)/2]$). Deux classes de gènes à nouveau ressortent de cette comparaison, ceux dont le rapport CpG observés sur CpG attendus (O/E) est supérieur à 0,6 comprenant les promoteurs du *Gnrhr*, d'*Isl1* et d'*Hprt*, les

autres gènes ayant un rapport O/E inférieur à 0,6 (*Fshβ*, *Lhβ*, *Cga*, *Prl* et *Pomc*) (**Figure 15b**). Seulement deux parmi ces gènes possèdent un îlot CpG, *Isl1* et *Hprt*, et 5 possèdent une boîte TATA, *Fshβ*, *Lhβ*, *Cga*, *Prl* et *Pomc*. Le *Gnrhr* n'appartient ni à l'une ni à l'autre classe.

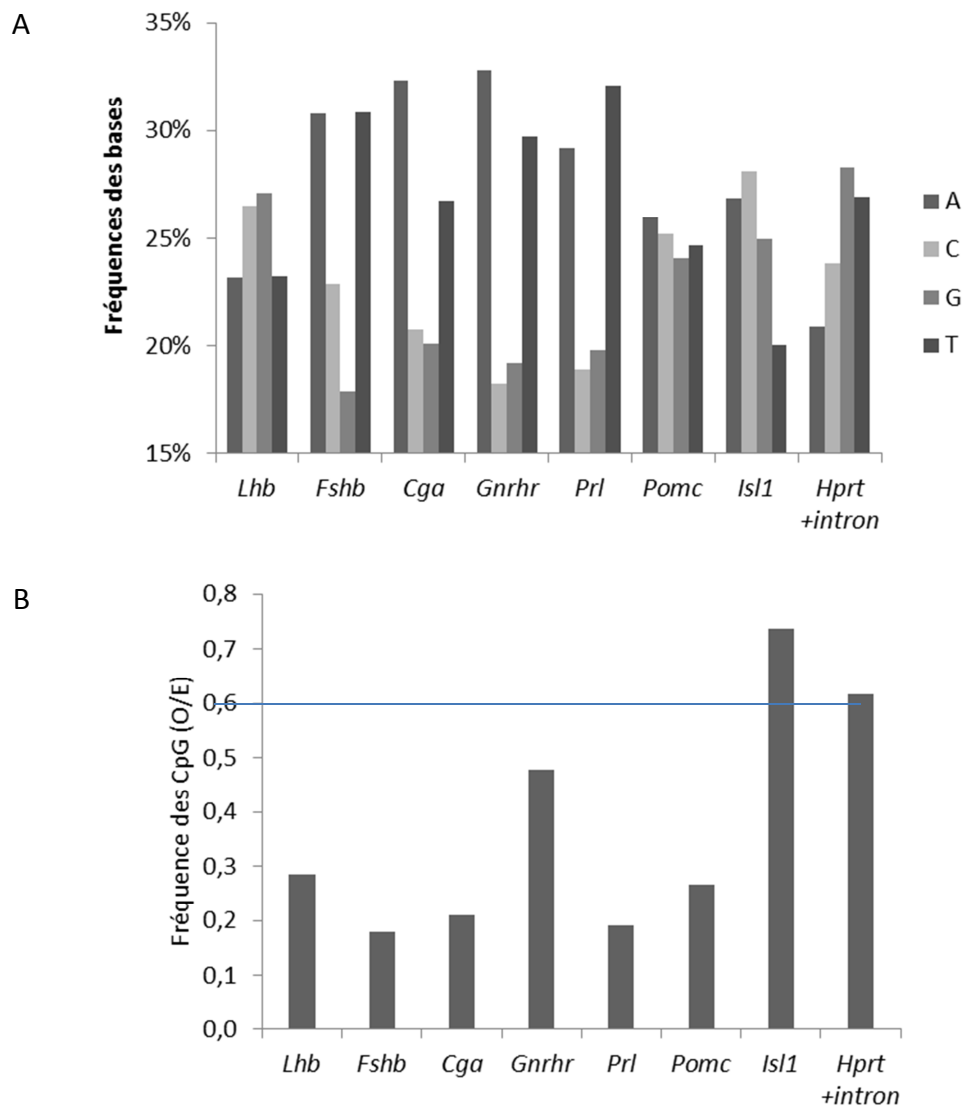


Figure 15
Étude comparée des promoteurs des gènes *Lhb*, *Fshb*, *Cga*, *Gnrhr*, *Prl*, *POMC*, *Isl1* et *Hprt*.

A : Fréquence (en pourcentage) de chaque base présente dans les 2kb en amont du site d'initiation des promoteurs de chaque gène. Pour le gène *Hprt*, cette fréquence a été calculée en prenant en compte le premier intron qui contient l'îlot CpG.

B : Fréquence des CpG (rapport des CpG observés sur les CpG attendus) dans les 2kb en amont du site d'initiation des promoteurs de chaque gène. Pour le gène *Hprt*, cette fréquence a été calculée en tenant compte du premier intron. La ligne bleue correspond à la valeur de 0.6 qui est la limite inférieure de fréquence des CpG pour laquelle l'on définit la présence d'un îlot CpG.

3.4.2 Modifications des histones

Nous avons recherché les corrélations entre l'expression de ces gènes, la structure de leur promoteur et des modifications des histones dans les lignées gonadotropes α T3-1 et L β T2, corticotrope AtT20, lacto-somatotrope GH3B6 ainsi que dans la lignée hypothalamique GT1-7. A cette fin, la chromatine de ces différentes lignées a été isolée après fixation *in vivo* par la formaldéhyde puis immunoprécipitée par différents anticorps capables de reconnaître les modifications de l'histone H3 suivantes :

- Acétylation des Lys 9 et 14
- Acétylation de la Lys 14
- Triméthylation de la Lys 4
- Triméthylation de la Lys 27

L'anticorps anti-polymérase II phosphorylé sur la Ser5 a été utilisé comme contrôle théoriquement positif de la transcription du gène. Le bruit de fond (ou contrôle négatif) est déterminé en absence d'anticorps tandis que la référence positive est obtenue par amplification de l'ADN isolé de la chromatine avant immunoprécipitation (apport total, input ou 100%).

Nous avons dans un premier temps procédé à l'analyse semi-quantitative des ADN obtenus par immunoprécipitation de la chromatine. A cette fin, les ADN ont été amplifiés par PCR classique en prélevant des échantillons en cours d'amplification, en général à 4 cycles d'intervalle, à 30, 34 et 38 cycles. Cette approche nous a permis d'évaluer aussi la qualité des immunoprécipitations dont certaines ont été ensuite analysées par PCR quantitative en temps réel.

3.4.2.1 Analyses des gènes ubiquiste et non gonadotropes

Globalement, nous avons pu observer que les modifications de la Lys 4 et de la Lys 27 par triméthylation (respectivement K4Me3 et K27Me3) étaient sans conteste les plus révélatrices et les mieux corrélées à l'état d'activité des gènes analysés. Sur ces bases, nous avons considéré préférentiellement le rapport K4Me3/K27Me3. Lorsque celui-ci est largement supérieur à 1, le gène se révèle actif et se situe dans un environnement chromatinien ouvert. S'il est inférieur à 1, le gène se localise dans un environnement

chromatinien fermé. Nous avons ensuite tenté d'évaluer l'importance des autres modifications et du recrutement de la RNA Pol II au site d'initiation.

Le gène Hprt

L'analyse des marques de modifications sur le gène *Hprt* (**Figure 16**), gène d'expression ubiquiste, révèle le recrutement de la marque K4Me3 (triméthylation sur la lysine 4, marque d'activité, chromatine ouverte) dans toutes les lignées, à l'exception de la lignée GH3 lacto-somatotrope où, exceptionnellement, ce gène est connu pour y être réprimé (Melmed, 1982). Dans ce cas précis, c'est la marque K27Me3 (triméthylation de la Lys 27, marque d'inactivité, chromatine fermée) qui prédomine. La présence de la RNA Pol II est également clairement recrutée lorsque K4Me3 est présente s'accompagnant de la présence assez variable des histones portant les acétylations sur les lysines 9 et 14. Dans les cellules GH3B6, les marques d'acétylation ne sont pas détectées, ni par PCR quantitative, ni par PCR semi-quantitative.

Les gènes Prl et Pomc

Le gène *Prl* (**Figure 17**) est exprimé dans la lignée lacto-somatotrope GH3B6 et la *Pomc* (**Figure 18**) dans la lignée corticotrope AtT20. Ces deux gènes portent la marque d'activité K4Me3 dans leurs lignées respectives, nettement détectées au cycle 34. Egalement présente la RNA Pol II, confirmant la corrélation entre activité transcriptionnelle, et présence de la RNA Pol II avec la marque K4Me3 sur de ces deux gènes dans les deux lignées. Les résultats en PCR quantitative confirment ces observations, illustrant un rapport K4Me3/K27Me3 nettement supérieur à 1. Les marques d'acétylation K14 et K9 sont également recrutées.

En conclusion, l'analyse des marques de modification de ces trois gènes illustrent clairement que l'activité transcriptionnelle s'accompagne de la présence prédominante d'histone portant une Lys4 triméthylée (K4Me3) avec un rapport K4Me3/K27Me3 nettement supérieur à 1, témoin d'une structure chromatinienne ouverte et favorisant la transcription. Le gène *Hprt*, dont la structure du promoteur est différente de celle de *Prl* et *Pomc*, obéit aux mêmes règles, suggérant que les modifications d'histones sont indépendantes de la structure du promoteur.

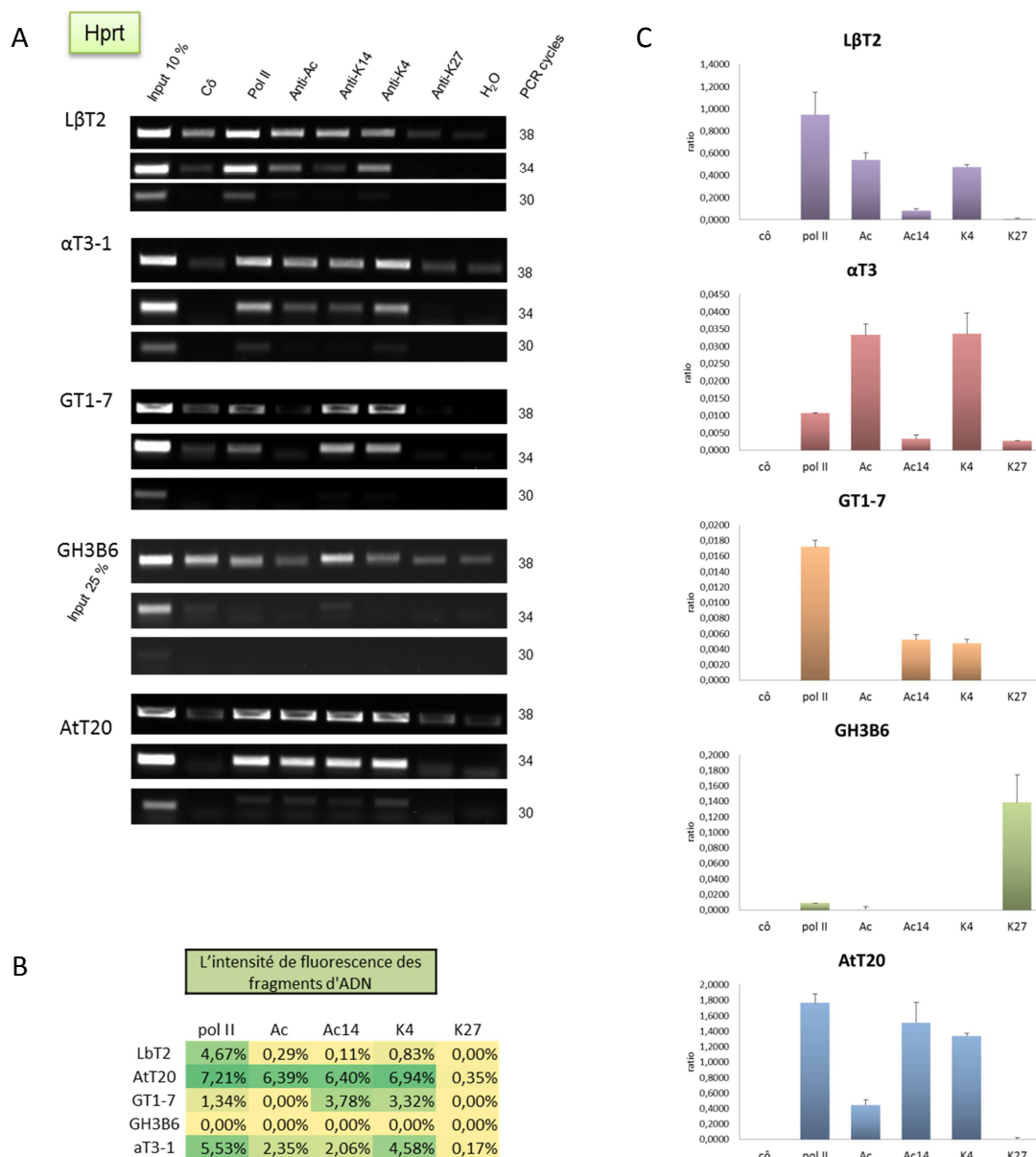


Figure 16
Analyse des marques de modification des histones sur le gène *Hprt*

A : PCR semi-quantitative à 30 cycles, 34 cycles et à 38 cycles en utilisant comme matrice les ADN isolés à partir de la chromatine immunoprécipitée par différents anticorps : **c ϕ** , pas d'anticorps, **pol II**, anticorps anti polymérase II (phosphorylée en S5), **Ac**, anti-histone H3 acétylée en K9 & K14, **Ac14**, anti-histone H3 acétylée en K14, **K4**, anti-histone H3 triméthylée sur K4, **K27**, anti-histone H3 triméthylée sur K27. Les chromatines immunoprécipitées ont été isolées des 5 lignées indiquées.

B : Mesure de l'intensité de fluorescence (en pourcentage) à l'aide du logiciel Image J des fragments d'ADN amplifiés par PCR semi-quantitative dans chaque lignée. Le gradient de couleur est proportionnel à l'intensité de fluorescence, s'étageant du jaune clair pour les faibles intensités au vert foncé pour les plus fortes.

C : PCR quantitative en temps réel dans chaque lignée.

Les amorces utilisées en PCR quantitative et semi-quantitative sont identiques et situées à proximité du site d'initiation de la transcription. Les séquences sont précisées dans le chapitre Matériels et Méthodes.

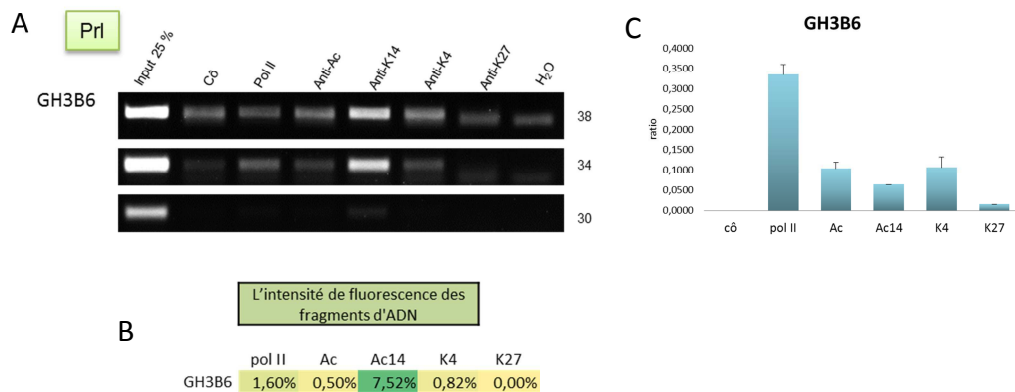


Figure 17
Analyse des marques de modification des histones sur le gène *Prl* dans la lignée lacto-somatotrope GH3B6

A : PCR semi-quantitative à 30 cycles, 34 cycles et à 38 cycles en utilisant comme matrice les ADN isolés à partir de la chromatine immunoprécipitée par différents anticorps : **cô**, pas d'anticorps, **pol II**, anticorps anti polymérase II (phosphorylée en S5), **Ac**, anti-histone H3 acétylée en K9 & K14, **Ac14**, anti-histone H3 acétylée en K14, **K4**, anti-histone H3 triméthylée sur K4, **K27**, anti-histone H3 triméthylée sur K27. La chromatine immunoprécipitée a été isolée de la lignée lacto-somatotrope GH3B6.

B : Mesure de l'intensité de fluorescence (en pourcentage) à l'aide du logiciel Image J des fragments d'ADN amplifiés par PCR semi-quantitative dans chaque lignée. Le gradient de couleur est proportionnel à l'intensité de fluorescence, s'étageant du jaune clair pour les faibles intensités au vert foncé pour les plus fortes.

C : PCR quantitative en temps réel réalisée sur les mêmes échantillons. Les amorces utilisées en PCR quantitative et semi-quantitative sont identiques et situées à proximité du site d'initiation de la transcription. Les séquences sont précisées dans le chapitre Matériels et Méthodes.

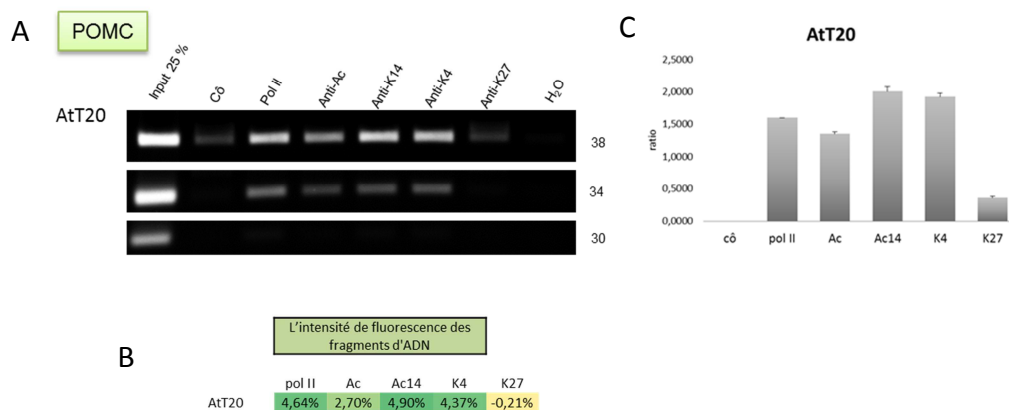


Figure 18
Analyse des marques de modification des histones sur le gène *POMC* dans la lignée corticotrope AtT20

A : PCR semi-quantitative à 30 cycles, 34 cycles et à 38 cycles en utilisant comme matrice les ADN isolés à partir de la chromatine immunoprécipitée par différents anticorps : **cô**, pas d'anticorps, **pol II**, anticorps anti polymérase II (phosphorylée en S5), **Ac**, anti-histone H3 acétylée en K9 & K14, **Ac14**, anti-histone H3 acétylée en K14, **K4**, anti-histone H3 triméthylée sur K4, **K27**, anti-histone H3 triméthylée sur K27. La chromatine immunoprécipitée a été isolée de la lignée corticotrope AtT20.

B : Mesure de l'intensité de fluorescence (en pourcentage) à l'aide du logiciel Image J des fragments d'ADN amplifiés par PCR semi-quantitative dans chaque lignée. Le gradient de couleur est proportionnel à l'intensité de fluorescence, s'étageant du jaune clair pour les faibles intensités au vert foncé pour les plus fortes.

C : PCR quantitative en temps réel réalisée sur les mêmes échantillons.

Les amorces utilisées en PCR quantitative et semi-quantitative sont identiques et situées à proximité du site d'initiation de la transcription. Les séquences sont précisées dans le chapitre Matériels et Méthodes

3.4.2.2 Analyse des gènes potentiellement exprimés dans les cellules gonadotropes

Concernant *Isl1* (**Figure 19**), il est clair que le rapport K4Me3/K27Me3 est largement supérieur à 1 dans les lignées hypophysaires α T3-1, L β T2 et dans la lignée hypothalamique GT1-7 où ce gène est exprimé comme le démontrent les résultats concordants obtenus en transfection transitoire et en PCR quantitative. La RNA polymérase II (RNA Pol II) sous sa forme phosphorylée sur la Ser5 dans ces mêmes lignées constitue un témoin de l'activité transcriptionnelle d'*Isl1*. Les histones modifiées par acétylation sur les lysines 14 et 9 ou seulement 14 sont aussi recrutées. En revanche, dans la lignée lacto-somatotrope GH3B6 et la lignée corticotrope AtT20, le rapport K4Me3/K27Me3 est inférieur à 1 et corrélé avec le niveau faible ou non détecté des ARN messagers de *Isl1* dans ces deux lignées. La RNA Pol II n'est pas non plus détectée dans la lignée GH3B6 indiquant que le gène d'*Isl1* est inactif dans ces cellules. Par contre, dans la lignée AtT20, la RNA Pol II est nettement recrutée sur le promoteur d'*Isl1*. Compte tenu de la présence de K27Me3 sur ce même promoteur et de l'absence d'ARN messager de *Isl1* dans ces cellules, il est probable que la RNA Pol II est en "pause", non active, au site d'initiation de la transcription ou à proximité (Cheng et Sharp, 2003). De façon assez inattendue, les marques d'acétylation sur les lysines 9 et 14 sont présentes quel que soit l'état d'activité du gène.

Concernant le *Gnrhr* (**Figure 20**), on observe à nouveau une bonne corrélation entre le rapport K4Me3/K27Me3 largement supérieur à 1, la présence de la RNA Pol II et l'expression du gène dans les deux lignées gonadotropes α T3-1 et L β T2. Les marques d'acétylation sont également présentes. Dans les lignées cellulaires GH3B6 et AtT20, l'absence d'expression du gène est à nouveau corrélée avec un rapport K4Me3/K27Me3 largement en faveur de K27Me3 avec des marques d'acétylation présentes à des niveaux très variables : non détectés dans les cellules lacto-somatotropes, élevés dans les cellules corticotropes. Le *Gnrhr* semble être, tout comme le gène *Isl1*, dans un environnement chromatinien ouvert dans les lignées gonadotropes mais pas dans les lignées corticotrope et lacto-somatotrope. Enfin, le cas des cellules GT1-7 est tout à fait particulier puisqu'en l'absence d'expression du gène - le promoteur du *Gnrhr* est inactif en transfection transitoire et on ne détecte pas d'ARN messagers par PCR quantitative - K4Me3 et K27Me3 sont soit indétectables (PCR quantitative) soit très faiblement recrutées (PCR semi-quantitative, cycle 34) dans un rapport

proche de 1, comme en état d'équilibre entre activité et inactivité. La RNA Pol II n'est pas détectée, suggérant que le gène du récepteur est inactif dans cette lignée, comme attendu.

Pour conclure sur ces deux gènes, *Isl1* et *Gnrhr* portent les mêmes marques épigénétiques en fonction de l'expression des gènes dans les différentes lignées testées. Malgré des promoteurs aux structures différentes, notamment leur richesse respective en C et G, les modifications des histones sont les mêmes, apportant ainsi un début d'explication à la régulation transcriptionnelle d'*Isl1* qui s'effectuerait *via* une conformation chromatinienne ouverte ou fermée (rapport K4Me3/K27Me3), régulant l'accès du promoteur aux facteurs de transcription. Le recrutement de la RNA Pol II phosphorylée n'apparaît pas systématiquement corrélé à une transcription active au moins dans le cas d'*Isl1*. Enfin les marques d'acétylation, à nouveau, et de manière assez surprenante, sont peu corrélées à l'état d'activité de ces deux gènes.

L'analyse des trois autres gènes exprimés dans les cellules gonadotropes adultes, *Lhβ*, *Fshβ* et *Cga* pouvait être particulièrement informative dans la mesure où les deux lignées gonadotropes se situent à un stade de développement différent, plutôt immature dans le cas de la lignée αT3-1 qui n'exprime que le *Gnrhr* et *Cga* et plus différencié dans le cas des cellules LβT2 qui expriment les quatre gènes.

Analyse de Cga

Le gène *Cga* (**Figure 21**) code pour la sous-unité commune aux hormones TSH, produite par les cellules thyroïdiques, et LH et FSH produites par les cellules gonadotropes. Les cellules αT3-1 et LβT2 expriment toutes deux à un niveau élevé la CGA. Ceci est parfaitement corrélé avec la présence de K4Me3 et de la RNA Pol II. Dans les cellules GH3B6 la RNA Pol II est décelée, conjointement avec K27Me3 et les marques d'acétylation si l'on considère à la fois les données de PCR semi-quantitative et quantitative. Dans les cellules GT1-7, aucune marque n'est détectée et la RNA Pol II est absente. Enfin, seule la RNA Pol II et la marque d'acétylation sur la Lys 14 sont détectées dans les cellules AtT20.

Analyse de Lhβ

Dans les lignées non gonadotropes (**Figure 22**), GH3B6 et AtT20, le rapport K4Me3/K27Me3 est respectivement nettement inférieur à 1 et proche de 1 avec des niveaux

respectifs de K4Me3 et K27Me3 très faibles. Dans les deux lignées, on détecte la RNA Pol II. Dans les cellules GT1-7, analysés seulement en PCR semi-quantitative, les marques K4Me3 et K27Me3 sont à nouveau faiblement recrutées dans un rapport proche de 1 tandis que la RNA Pol II n'est pas significativement recrutée. Enfin dans ces trois lignées, les marques d'acétylation sur la Lys14 sont très nettement présentes.

Dans les 2 lignées gonadotropes la RNA Pol II est présente mais les marques d'activité et d'inactivité sont différemment recrutées. K27Me3 est prédominante dans la lignée α T3-1 où *Lh β* n'est pas exprimé. Dans la lignée L β T2 où *Lh β* s'exprime, K4Me3 semble légèrement prédominante, les deux marques étant présentes à un niveau faible (en PCR quantitative). A nouveau, les marques d'acétylation semblent manifestes et non corrélées à l'activité du gène.

Analyse de Fsh β

Dans les lignées non gonadotropes, les marques d'activité et d'inactivité sont réparties sur *Fsh β* (**Figure 23**) de manière très semblable à *Lh β*

Dans les lignées gonadotropes la situation est différente. Comme précisé plus haut, ce gène n'est pas exprimé dans les cellules α T3-1 et on retrouve un rapport K4Me3/K27Me3 inférieur à 1. Dans les cellules L β T2 où ce gène s'exprime à très faible niveau et sous traitement par l'activine, les marques K4Me3 et K27Me3 sont soit indétectables (PCR semi-quantitative) soit très faibles avec une prédominance de la marque K27Me3. La RNA Pol II est recrutée sur le gène dans les deux lignées. Concernant la *Lh β* et la *Fsh β* dans les cellules L β T2, gènes faiblement ou très faiblement exprimés dans ces cellules, l'environnement chromatinien semble mal défini, ni clairement ouvert puisque la marque K4Me3 est respectivement soit faiblement représentée soit indétectable, ni clairement fermé puisque la marque K27Me3 est respectivement soit proche du niveau de K4Me3 soit simplement faiblement représentée. Au contraire, *Cga* arbore les marques d'un environnement chromatinien clairement actif. On peut émettre l'hypothèse que *Fsh β* se situerait dans un environnement chromatinien intermédiaire en cours d'ouverture, *Lh β* dans un environnement plus ouvert et *Cga* dans un environnement ouvert.

Plus généralement, l'analyse de ces trois gènes confirme que :

1 – les marques d'acétylation testées ne sont pas corrélées de manière évidente à l'activité des gènes

2 – la présence de la RNA Pol II n'est pas révélatrice d'un état transcriptionnel actif

3 – le rapport K4Me3/K27Me3 inférieur ou proche de 1 est caractéristique d'un état transcriptionnel inactif résultant d'un environnement chromatinien fermé, la réciproque étant également vraie

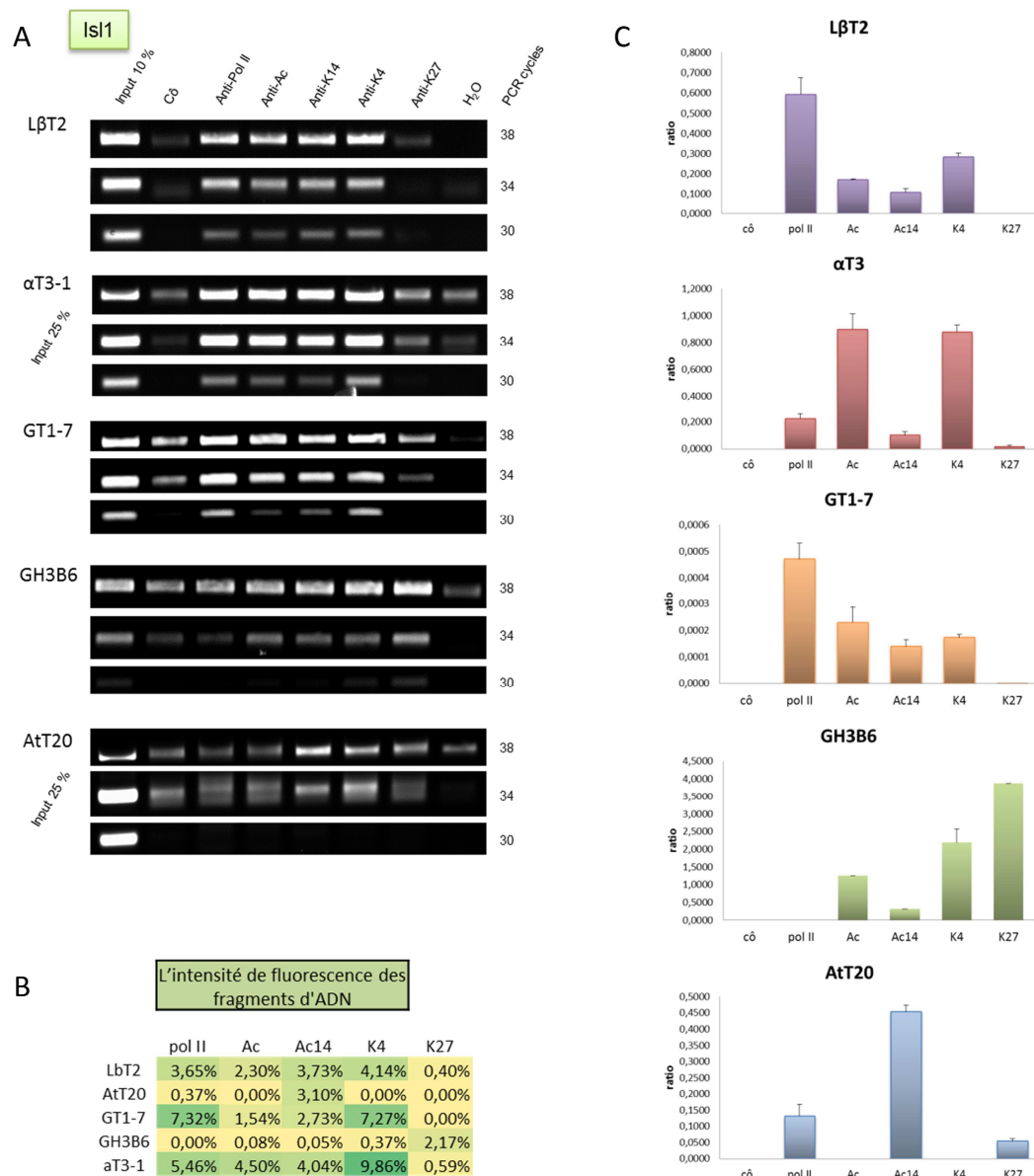


Figure 19
Analyse des marques de modification des histones sur le gène *Isl1*

A : PCR semi-quantitative à 30 cycles, 34 cycles et à 38 cycles en utilisant comme matrice les ADN isolés à partir de la chromatine immunoprécipitée par différents anticorps : **cô**, pas d'anticorps, **pol II**, anticorps anti polymérase II (phosphorylée en S5), **Ac**, anti-histone H3 acétylée en K9 & K14, **Ac14**, anti-histone H3 acétylée en K14, **K4**, anti-histone H3 triméthylée sur K4, **K27**, anti-histone H3 triméthylée sur K27. Les chromatines immunoprécipitées ont été isolées des 5 lignées indiquées.

B : Mesure de l'intensité de fluorescence (en pourcentage) à l'aide du logiciel Image J des fragments d'ADN amplifiés par PCR semi-quantitative dans chaque lignée. Le gradient de couleur est proportionnel à l'intensité de fluorescence, s'étageant du jaune clair pour les faibles intensités au vert foncé pour les plus fortes.

C : PCR quantitative en temps réel dans chaque lignée.

Les amorces utilisées en PCR quantitative et semi-quantitative sont identiques et situées à proximité du site d'initiation de la transcription. Les séquences sont précisées dans le chapitre Matériels et Méthodes

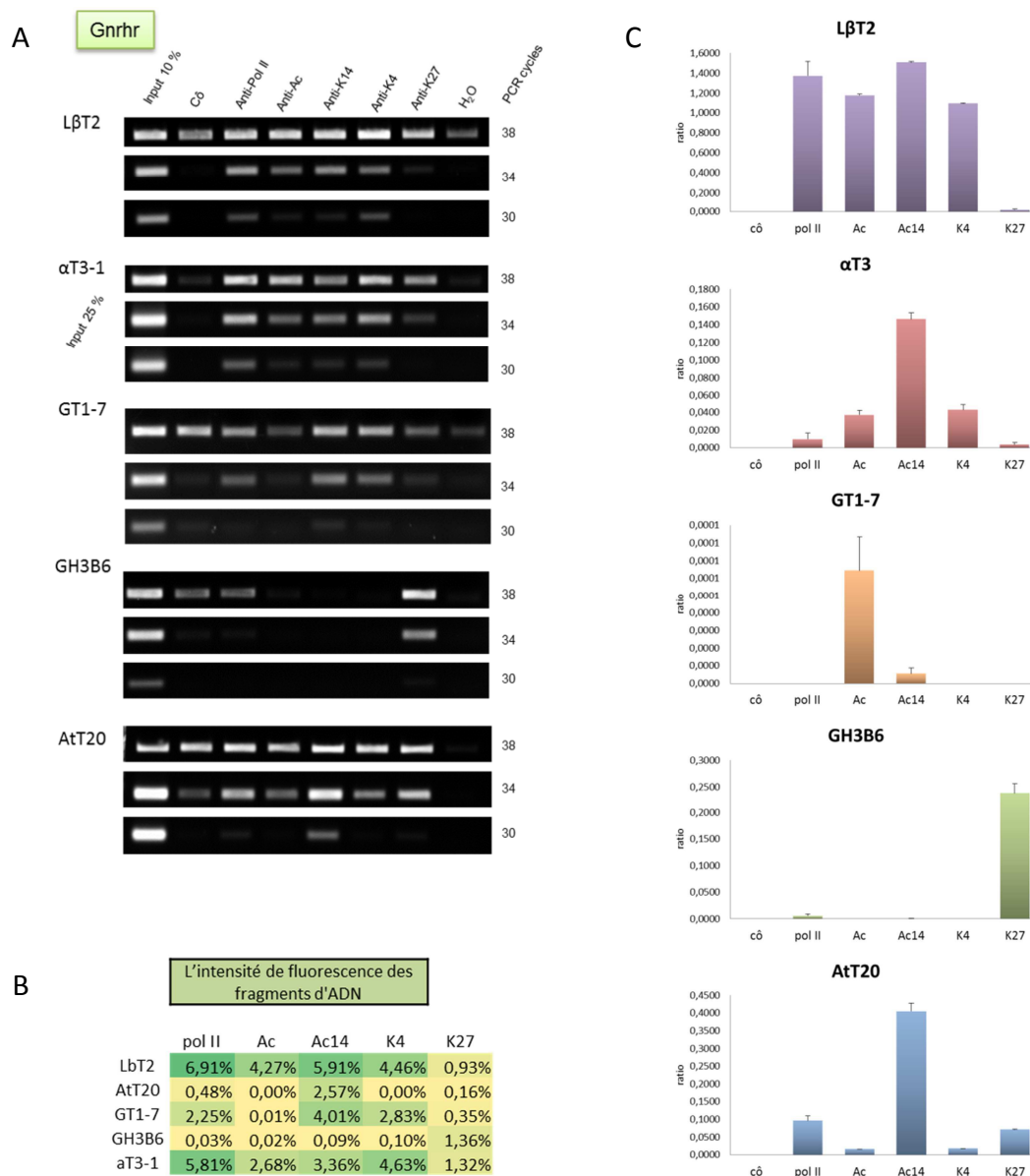


Figure 20
Analyse des marques de modification des histones sur le gène *Gnrhr*

A : PCR semi-quantitative à 30 cycles, 34 cycles et à 38 cycles en utilisant comme matrice les ADN isolés à partir de la chromatine immunoprécipitée par différents anticorps : **cô**, pas d'anticorps, **pol II**, anticorps anti polymérase II (phosphorylée en S5), **Ac**, anti-histone H3 acétylée en K9 & K14, **Ac14**, anti-histone H3 acétylée en K14, **K4**, anti-histone H3 triméthylée sur K4, **K27**, anti-histone H3 triméthylée sur K27. Les chromatines immunoprécipitées ont été isolées des 5 lignées indiquées.

B : Mesure de l'intensité de fluorescence (en pourcentage) à l'aide du logiciel Image J des fragments d'ADN amplifiés par PCR semi-quantitative dans chaque lignée. Le gradient de couleur est proportionnel à l'intensité de fluorescence, s'étageant du jaune clair pour les faibles intensités au vert foncé pour les plus fortes.

C : PCR quantitative en temps réel dans chaque lignée.

Les amorces utilisées en PCR quantitative et semi-quantitative sont identiques et situées à proximité du site d'initiation de la transcription. Les séquences sont précisées dans le chapitre Matériels et Méthodes

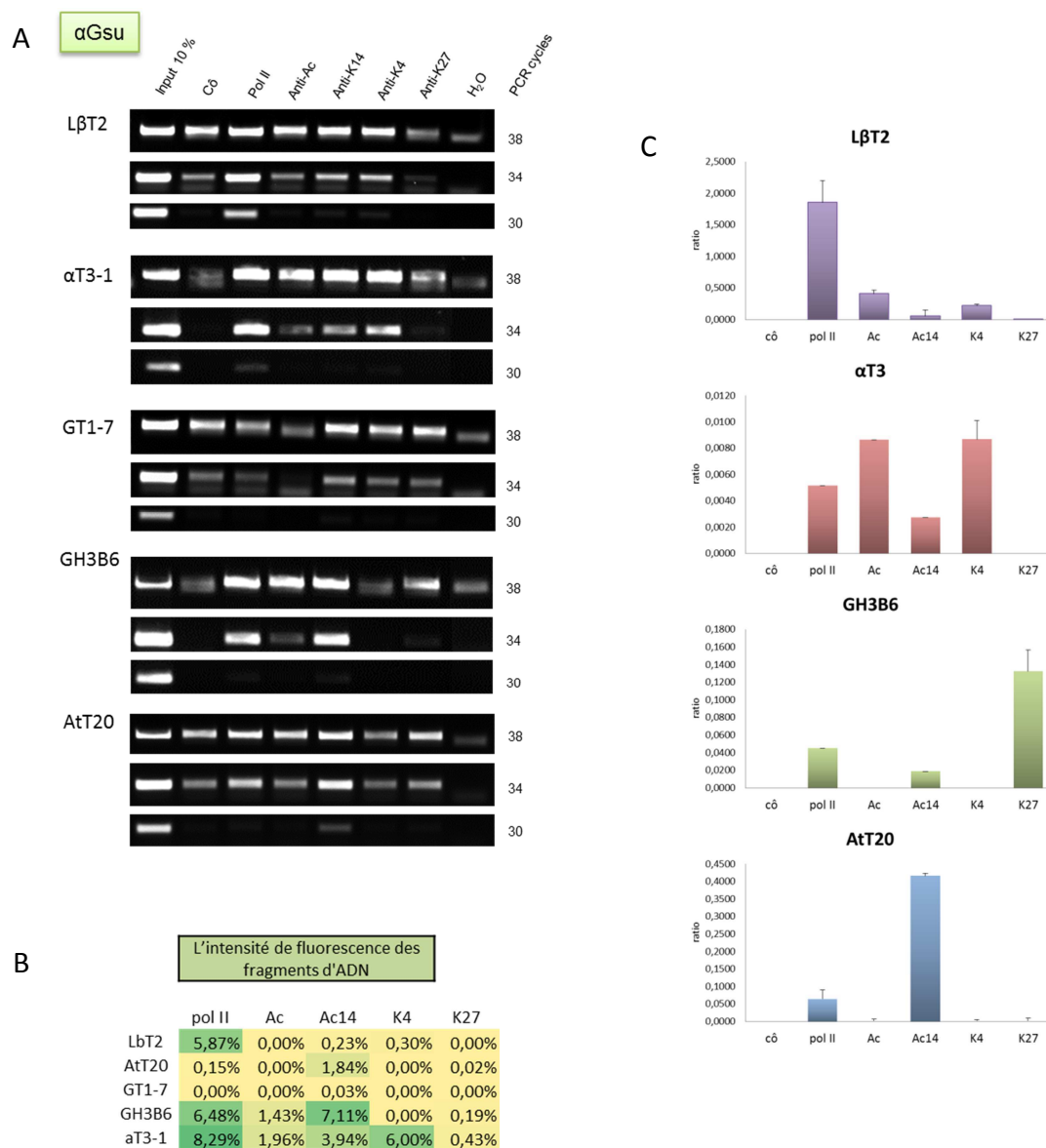


Figure 21
Analyse des marques de modification des histones sur le gène *αGsu*

A : PCR semi-quantitative à 30 cycles, 34 cycles et à 38 cycles en utilisant comme matrice les ADN isolés à partir de la chromatine immunoprécipitée par différents anticorps : **cô**, pas d'anticorps, **pol II**, anticorps anti polymérase II (phosphorylée en S5), **Ac**, anti-histone H3 acétylée en K9 & K14, **Ac14**, anti-histone H3 acétylée en K14, **K4**, anti-histone H3 triméthylée sur K4, **K27**, anti-histone H3 triméthylée sur K27. Les chromatines immunoprécipitées ont été isolées des 5 lignées indiquées.

B : Mesure de l'intensité de fluorescence (en pourcentage) à l'aide du logiciel Image J des fragments d'ADN amplifiés par PCR semi-quantitative dans chaque lignée. Le gradient de couleur est proportionnel à l'intensité de fluorescence, s'étageant du jaune clair pour les faibles intensités au vert foncé pour les plus fortes.

C : PCR quantitative en temps réel dans chaque lignée.

Les amorces utilisées en PCR quantitative et semi-quantitative sont identiques et situées à proximité du site d'initiation de la transcription. Les séquences sont précisées dans le chapitre Matériels et Méthodes

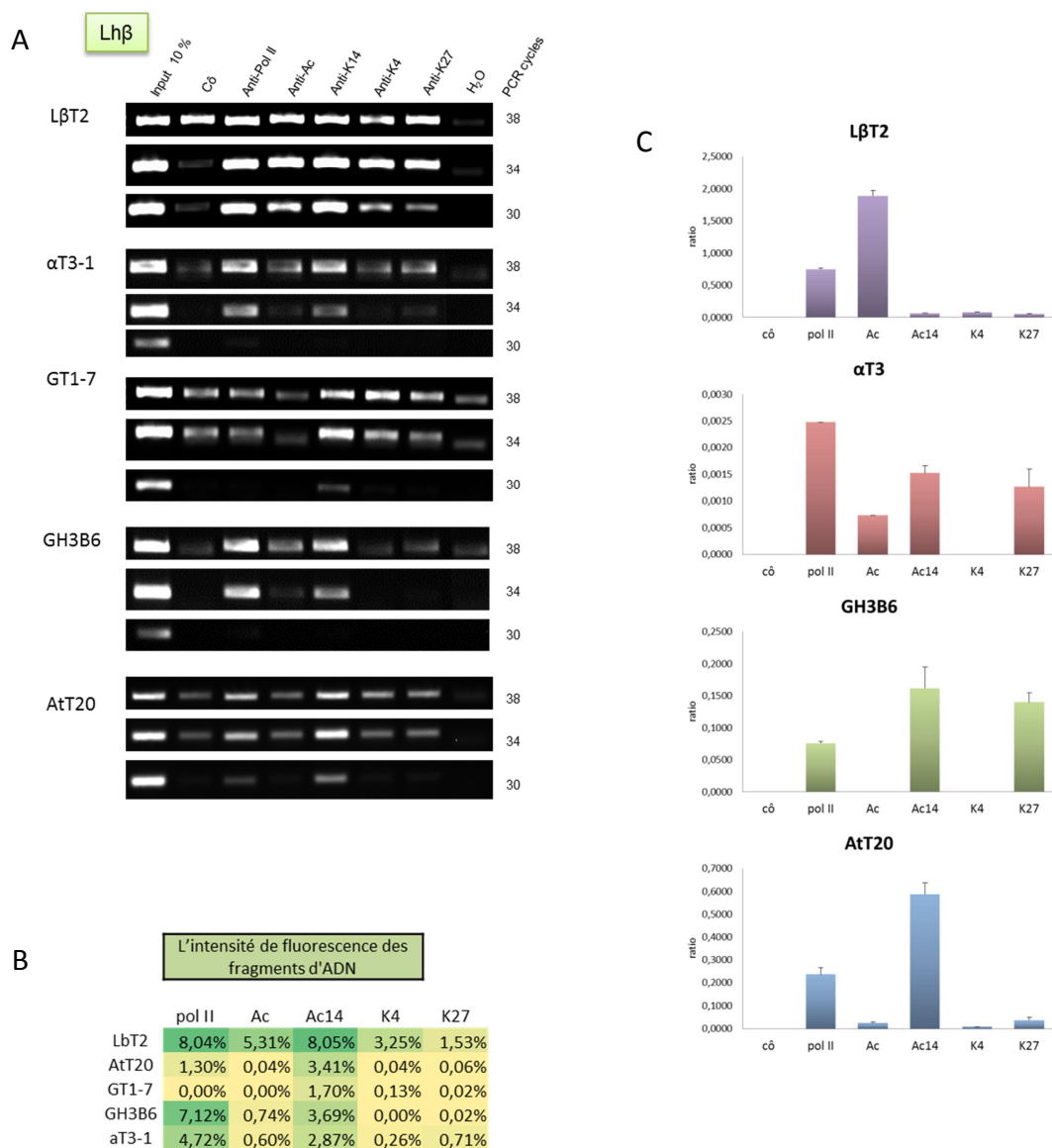


Figure 22
Analyse des marques de modification des histones sur le gène *Lhβ*

A : PCR semi-quantitative à 30 cycles, 34 cycles et à 38 cycles en utilisant comme matrice les ADN isolés à partir de la chromatine immunoprécipitée par différents anticorps : **cô**, pas d'anticorps, **pol II**, anticorps anti polymérase II (phosphorylée en S5), **Ac**, anti-histone H3 acétylée en K9 & K14, **Ac14**, anti-histone H3 acétylée en K14, **K4**, anti-histone H3 triméthylée sur K4, **K27**, anti-histone H3 triméthylée sur K27. Les chromatines immunoprécipitées ont été isolées des 5 lignées indiquées.

B : Mesure de l'intensité de fluorescence (en pourcentage) à l'aide du logiciel Image J des fragments d'ADN amplifiés par PCR semi-quantitative dans chaque lignée. Le gradient de couleur est proportionnel à l'intensité de fluorescence, s'étageant du jaune clair pour les faibles intensités au vert foncé pour les plus fortes.

C : PCR quantitative en temps réel dans chaque lignée.

Les amorces utilisées en PCR quantitative et semi-quantitative sont identiques et situées à proximité du site d'initiation de la transcription. Les séquences sont précisées dans le chapitre Matériels et Méthodes

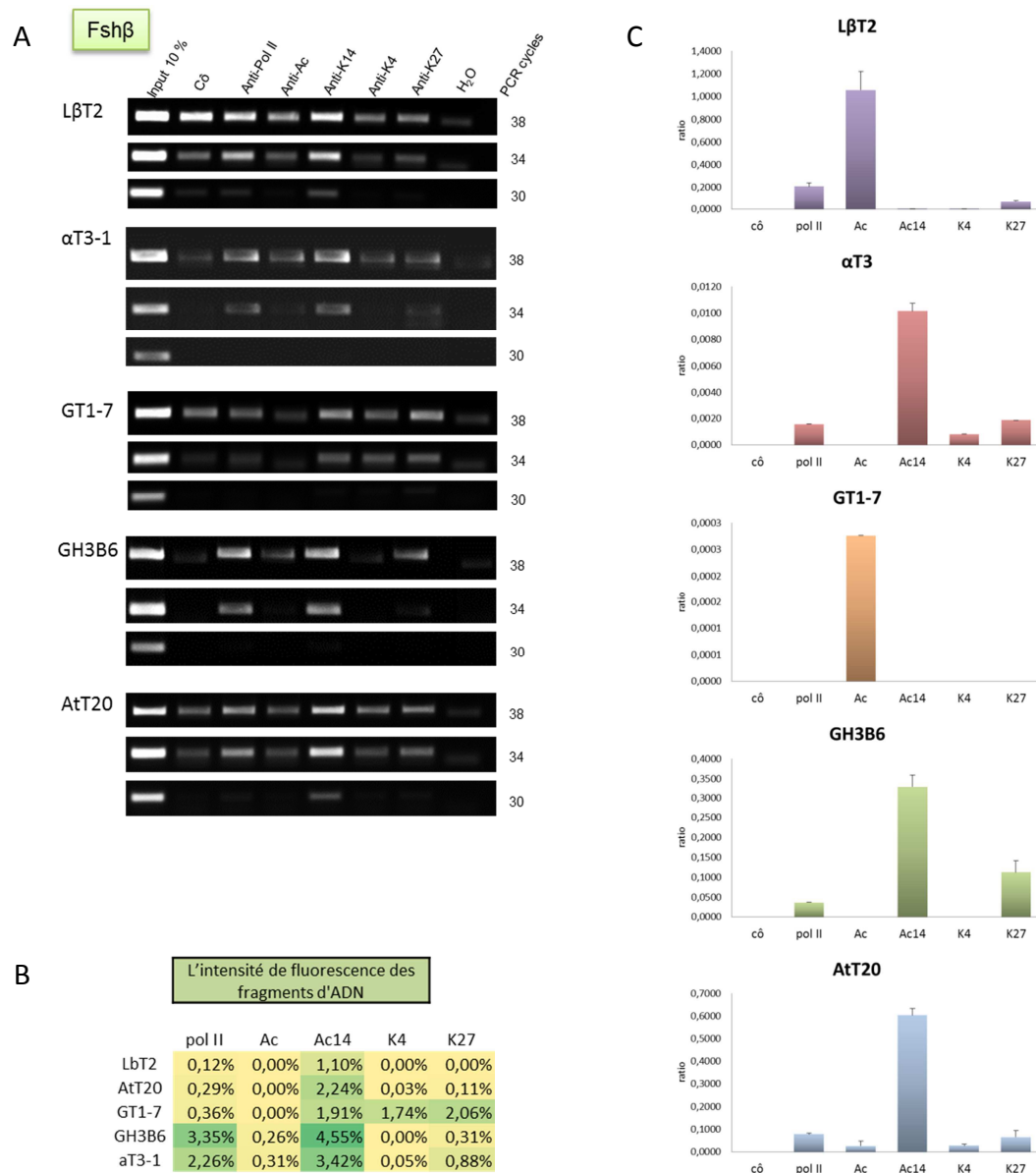


Figure 23
Analyse des marques de modification des histones sur le gène *Fsh β*

A : PCR semi-quantitative à 30 cycles, 34 cycles et à 38 cycles en utilisant comme matrice les ADN isolés à partir de la chromatine immunoprécipitée par différents anticorps : **cô**, pas d'anticorps, **pol II**, anticorps anti polymérase II (phosphorylée en S5), **Ac**, anti-histone H3 acétylée en K9 & K14, **Ac14**, anti-histone H3 acétylée en K14, **K4**, anti-histone H3 triméthylée sur K4, **K27**, anti-histone H3 triméthylée sur K27. Les chromatines immunoprécipitées ont été isolées des 5 lignées indiquées.

B : Mesure de l'intensité de fluorescence (en pourcentage) à l'aide du logiciel Image J des fragments d'ADN amplifiés par PCR semi-quantitative dans chaque lignée. Le gradient de couleur est proportionnel à l'intensité de fluorescence, s'étageant du jaune clair pour les faibles intensités au vert foncé pour les plus fortes.

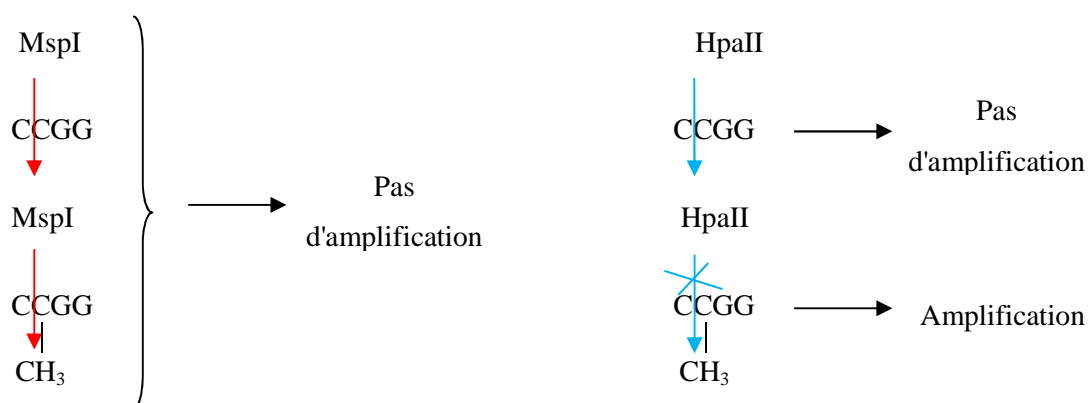
C : PCR quantitative en temps réel dans chaque lignée.

Les amorces utilisées en PCR quantitative et semi-quantitative sont identiques et situées à proximité du site d'initiation de la transcription. Les séquences sont précisées dans le chapitre Matériels et Méthodes

3.4.3 Analyse de l'état de méthylation dans les différentes lignées

Pour analyser l'état de la méthylation du promoteur d'*Isl1* dans les lignées cellulaires nous avons choisi une méthode simple de criblage rapide par amplification de l'ADN génomique coupé ou non par des enzymes de restriction. Cette première approche sera suivie d'une caractérisation de l'état de méthylation de chaque dinucléotide CpG par traitement de l'ADN au bisulfite de sodium et séquençage. Cette approche n'a pu encore être finalisée et les résultats exposés se limiteront à ceux obtenus *via* la première méthodologie.

Afin d'étudier les sites de méthylation possible au niveau du promoteur du gène *Isl1* en amont du site d'initiation de la transcription, nous avons extrait les ADN génomiques des lignées cellulaires α T3-1, AtT20, GH3B6, GT1-7 et L β T2. Ces ADN ont été ensuite digérés avec les enzymes de restriction HpaII et MspI. Ces enzymes reconnaissent la même séquence tetranucléotidique intégrant un CpG. L'activité de ces isoschisomères est dépendante de la méthylation du dinucléotide CpG central. MspI coupe l'ADN méthylé et non méthylé sur la deuxième cytosine du motif CCGG. C'est le contrôle négatif de notre étude qui doit prévenir toute amplification lors de la PCR. HpaII, à l'inverse, ne digère pas l'ADN lorsque la deuxième cytosine est méthylée engendrant un fragment amplifié. Les actions respectives de ces enzymes sont illustrées sur le schéma ci-dessous.



L'analyse *in silico* des 5000 pb du promoteur d'*Isl1* de souris et de rat en amont du site d'initiation de la transcription nous ont permis de dessiner les amorces figurant dans le tableau ci-contre et permettant de délimiter trois régions sur le promoteur de souris (toutes les lignées

exceptée la lignée GH3B6 sont des lignées murines) et trois sur le promoteur de rat (les cellules GH3B6 dérivent du rat) (**Figures 24**) à amplifier par PCR.

IslCm25	5'-gctgaacccttctacgattc-3'	IslCm23	5'-catgtctgtctatggatctgt-3'
IslCm35	5'-acagatccatagacagacatg-3'	IslCm33	5'-ccgcggaccttgggctgcgct-3'
IslCm45	5'-agcgcagcccaaggtccgcgg-3'	IslCm43	5'-ctcttccttatctcttactc-3'

Tableau des amorces du promoteur du gène *IslI* de souris.

RislCm25	5'-catgcccattgtacaag-3'	RislCm23	5'-gaaatgtagaaggcttcaac-3'
RislCm35	5'-acagcagacctcacaggt-3'	RislCm33	5'-gctccaggaaaaggaggagg-3'
RislCm45	5'-ccctccaccttttctggagc-3'	RislCm43	5'-taagaggaggtaatgtccacagtga-3'

Tableau des amorces du promoteur du gène *IslI* de rat.

Chez la souris, le fragment Islcm25/Islcm23 de 461 pb contient 7 CpG, sites potentiels de méthylation, dont deux (29%) sont situés dans un motif HpaII/MspI. Le fragment Islcm35/Islcm33 de 642 pb contient 34 CpG dont à nouveau deux (6%) seulement sont localisés dans des sites HpaII/MspI et enfin le fragment Islcm45/Islcm43 de 358 pb contient 47 CpG (îlot CpG) dont 5 (11%) sont situés dans des sites HpaII/MspI. Ce dernier fragment englobe l'îlot CpG et le site d'initiation de la transcription. Les amorces de rat sont destinées à étudier l'état de la méthylation d'*IslI* dans les cellules GH3B6. La taille du fragment Rislcm25/23 est de 534 pb avec 2 sites HpaII/MspI, celle du fragment Rislcm35/33 de 470 pb avec 3 sites HpaII/MspI et le fragment qui contient l'îlot CpG et le site d'initiation de la transcription de 663 pb avec 8 sites HpaII/MspI.

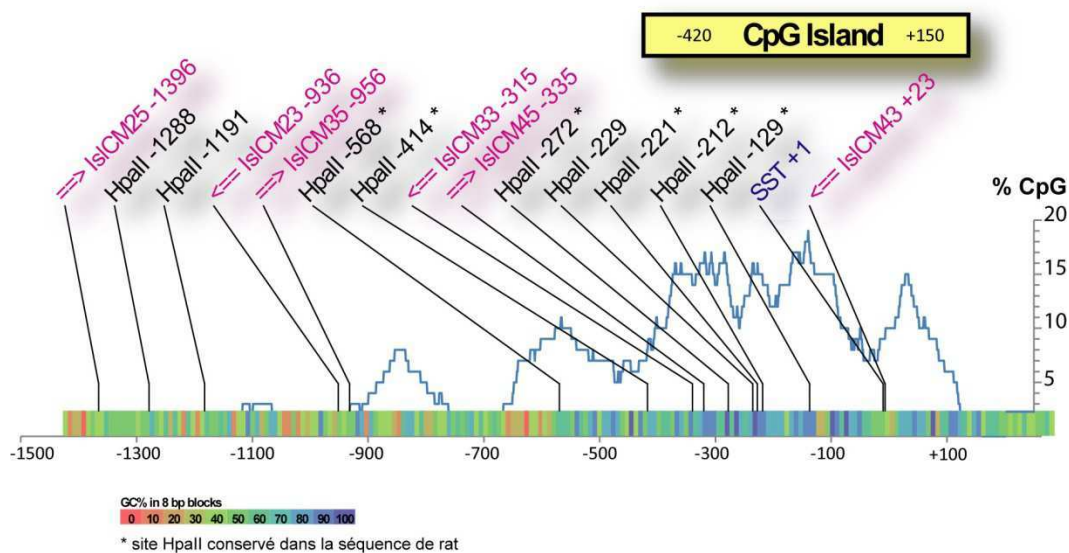


Figure 24
Étude *in silico* des sites CpG du gène *Isll* chez la souris

Le promoteur du gène d'*Isll* de souris (-1450/+1 pb) et une partie de l'exon1 sont représentés sous forme d'une barre colorée illustrant le taux de G + C (ex : zones rouges 0%, zones vertes 50%, zones violettes 100%, cf légende des couleurs). Au-dessus de cette barre, en arrière-plan, la fréquence des dinucléotides CpG est représentée par l'histogramme dessiné en bleu. Parmi ces dinucléotides, certains se situent dans un motif 5'CCGG 3' reconnu par HpaII et son isoschisme MspI (sites marqués HpaII sur la figure). Les 3 couples d'amorces utilisées (IslCM25 – 23, IslCM35 – 33 et IslCM45 – 43) pour amplifier l'ADN génomique après digestion enzymatique encadrent chacun un groupe de sites HpaII/MspI. Si l'un des sites du groupe comporte un CpG non méthylé, le traitement par HpaII induit une coupure double brin de l'ADN et, consécutivement, une absence de l'amplification par l'ADN polymérase. La position des amorces ainsi que celle des sites HpaII/MspI sont indiquées par rapport au site d'initiation de transcription (SST+1). L'îlot CpG est également indiqué (-420/+150).

(http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Summary?g=ENSMUSG00000042258;r=13:116298281-116309688 ; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/> ; <http://www.acaclone.com/>).

Les résultats des expériences de PCR sur les ADN génomiques après digestion par HpaII et MspI sont présentés sur les **Figures 25 et 26**. Dans la lignée hypophysaire gonadotrope LβT2 de souris, le fragment Islcm25/23 est amplifié à partir de l'ADN génomique non digéré (Cô) ainsi qu'à partir de l'ADN digéré par HpaII. Néanmoins, l'intensité de fluorescence du fragment HpaII est plus faible suggérant que le ou les 2 sites HpaII localisés dans ce fragment d'ADN sont partiellement méthylés, ne protégeant qu'en partie l'ADN de la digestion par HpaII. La digestion par MspI s'avère complète, prévenant toute amplification, comme attendu. Les fragments Islcm35/33 et Islcm45/43 ne sont pas amplifiés lorsque l'on digère l'ADN avec HpaII alors que l'ADN génomique est correctement amplifié. Les dinucléotides CpG situés sur les 7 sites HpaII localisés entre -956 et +23 ne sont donc pas méthylés. Une bande de faible intensité est visible après digestion de l'ADN par MspI et amplification du fragment Islcm35/33 suggérant une digestion incomplète.

La même analyse menée sur l'ADN extrait de la lignée hypophysaire gonadotrope αT3-1 de souris conduit à une conclusion identique, avec méthylation partielle de la région située en amont de -956 et l'absence de méthylation en aval, au moins pour les dinucléotides localisés dans les motifs CCGG. A nouveau une digestion incomplète de l'ADN par MspI est détectée après amplification du fragment Islcm25/23.

Après analyse sur gel des digestions par HpaII de l'ADN génomique des cellules de la lignée GT1-7 on observe un profil similaire à celui obtenu avec les cellules αT3-1 et LβT2. Après amplification par les amorces Islcm25/23 de l'ADN digéré par HpaII, on détecte un fragment dont l'intensité de fluorescence est plus faible que celle observée avec l'ADN génomique non digéré, suggérant la méthylation partielle des deux sites HpaII concernés situés à -1288 et -1191. Une bande de la même intensité est obtenue lorsque l'ADN est digéré par MspI, suggérant à nouveau une digestion incomplète de l'ADN. En revanche, aucune bande n'est détectée après amplification par les couples d'amorces Islcm35/33 et Islcm45/43 confirmant que la région du promoteur s'étendant de -956 à +23 et englobant l'îlot CpG est hypométhylée dans les lignées exprimant *Isl1*.

Concernant les cellules corticotropes AtT20 qui n'expriment pas *Isl1*, on observe un fragment de forte intensité après amplification par les couples d'amorces Islcm25/23 et

Islcm35/33 de l'ADN génomique digéré avec HpaII. En revanche, aucune amplification n'est détectée avec le couple Islcm45/43. Ces données suggèrent que le promoteur est hyperméthylé entre -1396 et -414 (site HpaII) et hypométhylé plus en aval, notamment au niveau de l'îlot CpG.

Enfin, concernant les cellules GH3B6, lignées lacto-somatotropes de rat, les amorces spécifiquement dessinées pour le gène de rat respectent approximativement les mêmes localisations que les amorces spécifiques de la souris. Les fragments Rislcm25/23, Rislcm35/33 et Rislcm45/43 amplifient respectivement des fragments de 468 pb (entre -1900 et -1433), 425 pb (entre -866 et -442) et 656 pb (entre -422 et +233) contenant 2, 3 et 8 sites HpaII/MspI. Après digestion par HpaII de l'ADN génomique, quel que soit le couple d'amorces utilisé, des fragments de forte intensité sont visibles sur gel, de tailles équivalentes à celles attendues en fonction des amorces. Des bandes de faible intensité sont détectées après amplification avec les couples Rislcm25/23 et Rislcm35/33 de l'ADN digéré par MspI suggérant une digestion incomplète de l'ADN. Ces données suggèrent que le promoteur de rat serait hyperméthylé non seulement dans sa région distale, comme dans les cellules corticotropes, mais également dans sa région plus proximale qui inclut l'îlot CpG.

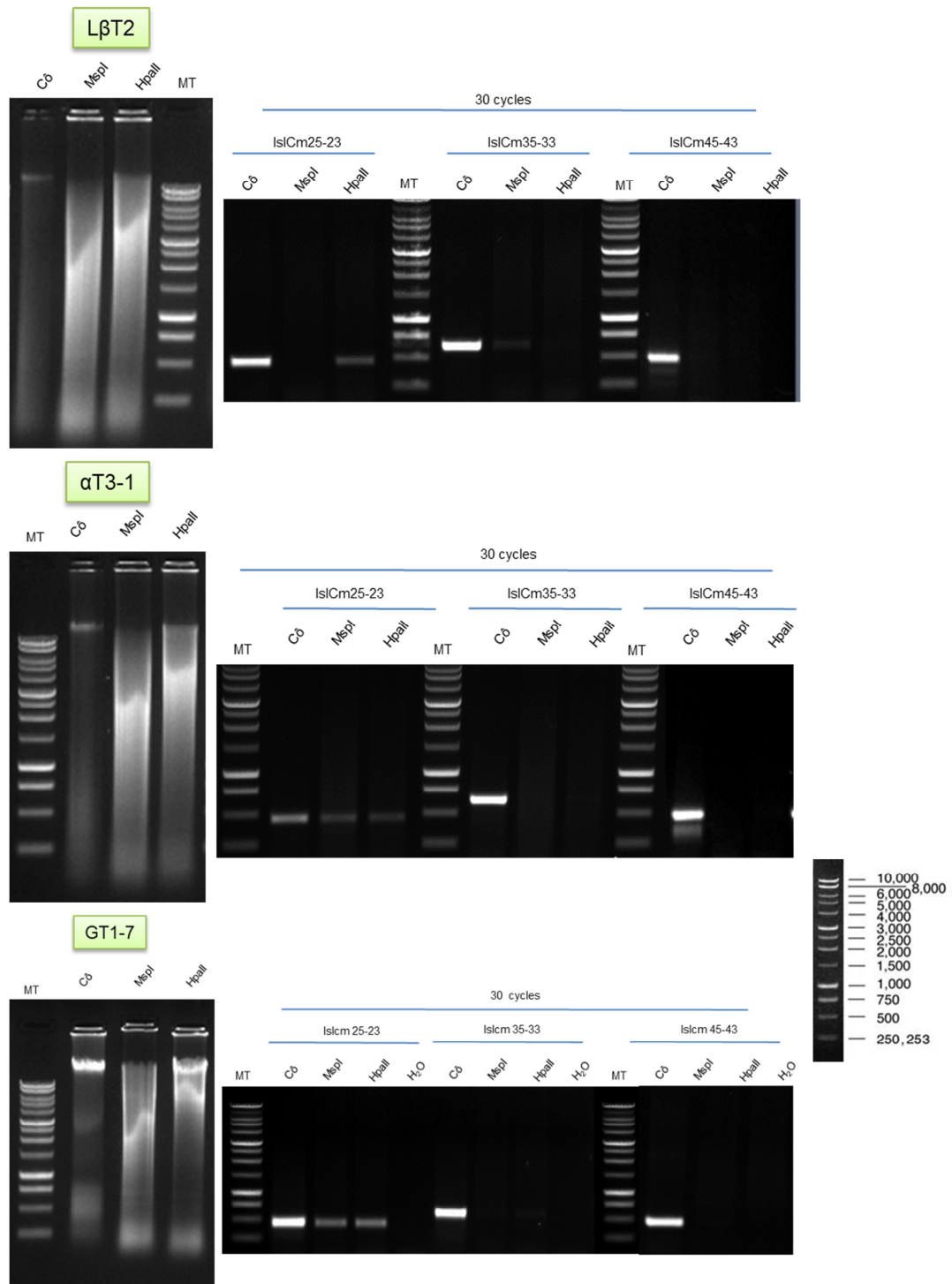


Figure 25
Étude de la méthylation du promoteur d'*IslI* par digestion enzymatique HpaII et MspI des ADN génomiques des lignées LβT2, αT3-1 et GT1-7.

Les ADN génomiques des lignées LβT2, αT3-1 et GT1-7 ont été extraits et digérés par les enzymes HpaII et MspI. L'ADN digéré a été ensuite utilisé comme matrice dans plusieurs réactions d'amplification sur 30 cycles avec les différentes amorces illustrées sur la Figure 24. Le profil de migration sur gel d'agarose des ADN intacts et digérés par HpaII ou MspI sont illustrés sur les panneaux de gauche. L'analyse sur gel d'agarose des produits des PCRs obtenus à partir de ces ADN sont illustrés sur les panneaux de droite, les marqueurs de taille étant figurés à gauche de chaque gel

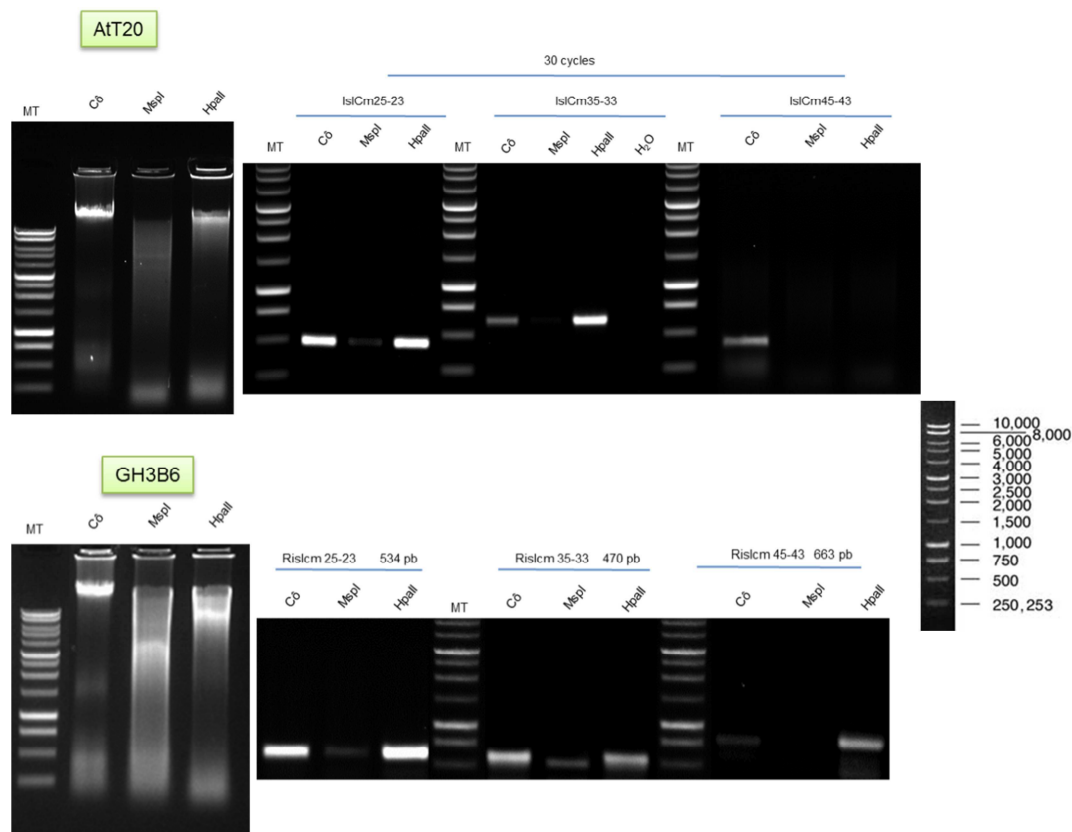


Figure 26
Étude de la méthylation du promoteur d'*IslI* par digestion enzymatique HpaII et MspI des ADN génomiques des lignées AtT20 et GH3B6

Les ADN génomiques des lignées AtT20 et GH3B6 ont été extraits et digérés par les enzymes HpaII et MspI. Une PCR de 30 cycles avec les différentes amorces déterminées sur la Figure 24 a suivi la digestion. Les produits des PCR ont migrés sur gel puis révélés. Le bon fonctionnement des digestions est vérifié par migration sur gel avant de procéder aux PCR (gels à gauche des PCR dans chaque lignée). Le marqueur de taille utilisé est le DNA 1 kb de Promega.

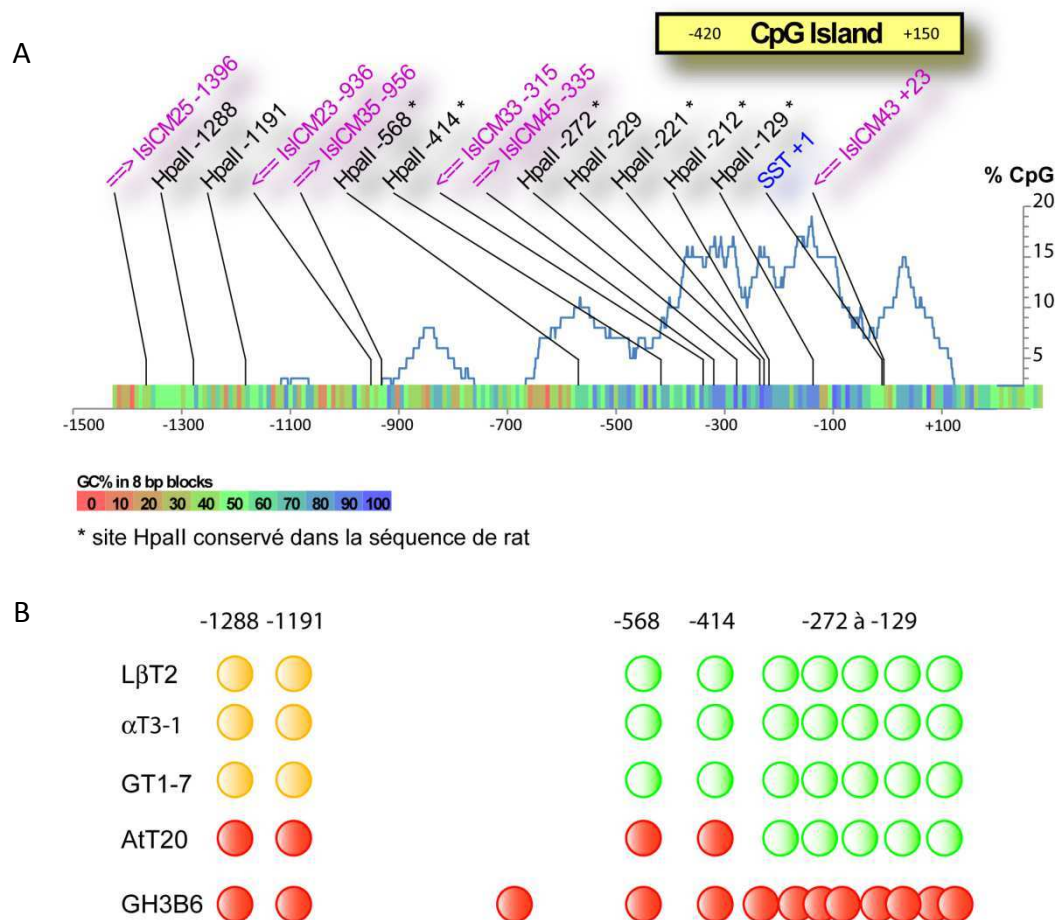


Figure 27
Profils de méthylation du promoteur d'*Isl1* dans les différentes lignées analysées.

A – Schéma du promoteur d'*Isl1* illustrant différents aspects relatifs à l'état de méthylation (cf figure 24).

B – Comparaison des profils de méthylation du promoteur d'*Isl1* dans les différentes lignées. Les dinucléotides analysés sont illustrés par des boules de différentes couleurs correspondant à l'état de méthylation : vertes, non méthylées ; jaunes, partiellement méthylées ; rouges, méthylées. La position des dinucléotides CpG dans les lignées murines sont indiqués en tête de chaque colonne. Les sites conservés chez le rat (lignée GH3B6) sont illustrés par des boules placées dans les colonnes correspondant aux sites identifiés dans les lignées murines, les boules supplémentaires hors colonnes correspondant aux sites additionnels HpaII analysés et présents exclusivement dans le promoteur de rat. Les deux lignées AtT20 et GH3B6 qui n'expriment pas *Isl1* arborent toutes deux des dinucléotides CpG méthylés en amont de l'îlot CpG (-414 à -1288), caractéristique commune qui pourrait être liée à la répression du gène dans ces lignées. La méthylation de l'îlot CpG dans les cellules GH3B6 traduirait plutôt le caractère tumoral de ces cellules

4 Discussion et conclusions

Au cours de ce travail, nous avons analysé divers modes de régulations géniques et épigénétiques d'*Isl1* à travers l'analyse de différentes lignées cellulaires représentatives des lignages hypophysaires. Nous avons ainsi montré que, quelle que soit la lignée, le promoteur d'*Isl1*, en transfection transitoire et donc en dehors de son contexte chromatinien, est très actif et capable de diriger l'expression du gène rapporteur luciférase. En revanche, l'expression du gène endogène, estimé par la mesure des ARNm, est restreinte à certaines de ces lignées, notamment les cellules représentatives du lignage gonadotrope, les cellules α T3-1 et L β T2. Les cellules du lignage lacto-somatotrope et corticotrope n'expriment pas *Isl1*. Ceci s'avère également vrai pour des lignées non hypophysaires. L'activité du promoteur en dehors de son contexte chromatinien, testée par transfection transitoire, est toujours élevée alors que l'expression du gène endogène est clairement restreinte à un petit nombre de lignées, en l'occurrence dans notre étude la lignée neuronale hypothalamique GT1-7. L'activité du promoteur d'*Isl1* est probablement régulée par des facteurs de transcription ubiquistes, présents dans toutes les lignées cellulaires testées. L'activité du promoteur du gène endogène serait régulée par la structure chromatinienne, qui, selon les lignées, serait ouverte ou fermée, permettant ou non l'accès de ces facteurs de transcription à leur(s) élément(s) cis-activateur(s). C'est l'hypothèse la plus vraisemblable d'après les marques de modification des histones et les profils de méthylation de l'ADN que nous avons analysés.

4.1 L'activité du promoteur d'*Isl1* est sous la dépendance de facteurs de transcription

L'analyse *in silico* de la séquence promotrice d'*Isl1* révèle la présence de plusieurs sites SP1 (35 dans les 3000 pb analysées) et trois sites Egr1 comportant chacun 1 mésappariement. Ces facteurs sont largement répandus dans la plupart des tissus et pourraient éventuellement participer à l'activation du promoteur transfecté dans les lignées cellulaires testées au cours de cette étude.

Par ailleurs, les expériences de ChIP-on-chip réalisées précédemment au laboratoire à partir de chromatine extraite de cellules gonadotropes (α T3-1) et immunoprécipitée avec un anticorps anti-FOXL2 ont mis en évidence que le promoteur du gène *Isl1* constituait l'une des cibles majoritaires de ce facteur de transcription. FOXL2 se fixerait au sein d'une région s'étendant de -2270 pb à -985 pb. L'analyse de cette région révèle effectivement des motifs spécifiques 5'-CTCAAGTC-3' (-2022/-2015) et 5'-AGCTTGAC-3' (-1829/-1822) susceptibles de lier FOXL2. Néanmoins, les expériences de co-transfection réalisées avec un vecteur d'expression de FOXL2 et le promoteur complet ou tronqué d'*Isl1* n'ont pas permis de mettre en évidence un quelconque effet de FOXL2 sur l'activité du promoteur. Il est possible que la capacité transactivatrice de FOXL2 requiert la présence d'un ou de plusieurs autres partenaires. Dans le cadre d'une telle hypothèse, FOXL2 est loin d'être présent dans la plupart des tissus et, en tout état de cause, ne pourrait à lui seul rendre compte de l'activité ubiquiste du promoteur *Isl1* transfecté.

Au cours du développement hypophysaire, l'expression d'*Isl1* est induite à E8.5 par BMP4 en provenance du diencéphale puis, un peu plus tard, vers E10.5, maintenue dans la partie ventrale de l'hypophyse par BMP2 sécrétée par le mésenchyme juxtahypophysaire. Dans les deux cas, ce sont les récepteurs des BMP qui sont donc impliqués. La signalisation intracellulaire de ces récepteurs à activité tyrosine kinase implique à la fois une voie engendrant l'activation des facteurs de transcription SMAD et des voies indépendantes des facteurs SMAD telle les voies des MAPK, c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 mitogen-activated protein kinases, AKT/PKB, petites GTPases et autres (Horbelt et al, 2012). Ces facteurs SMAD comme les facteurs de transcription stimulés par les autres voies de transduction sont donc susceptibles d'activer le promoteur d'*Isl1*.

Les études déjà effectuées sur la régulation d'*Isl1* dans d'autres tissus que l'hypophyse peuvent s'avérer également très instructives. Elles sont de deux types : celles qui portent sur le promoteur de 5kb que nous avons nous-mêmes analysé et celles, peut-être plus ambitieuses, qui portent sur l'identification d'éléments régulateurs dans l'ensemble du locus d'*Isl1*, en aval comme en amont et dans le corps du gène lui-même.

4.1.1 Eléments régulateurs présents sur le promoteur d'*Isl1* de 5kb

La première approche a ainsi permis d'identifier un élément de réponse à LEF1 (-2699/2693 - ACAAAGG), l'un des facteurs de transcription ultime de la voie Wnt/ β -caténine. Cet élément de réponse participerait à l'activation d'*Isl1* dans les progéniteurs cardiaques au cours du développement *via* le complexe LEF1/ β -caténine. Celle-ci est effectivement détectée par immunoprécipitation de chromatine et sa forme activée capable de stimuler l'activité du promoteur d'*Isl1* (Lin et al, 2007). Les auteurs montrent en outre que l'inactivation ciblée de la β -caténine dans ces progéniteurs cardiaques exprimant ISL1 se traduit par une forte diminution de l'expression d'ISL1 dès E8.0 et devient létale dès E10. L'analyse des embryons révèle de sévères anomalies de développement du myocarde touchant les structures dérivées du second (ou antérieur) champ cardiaque : absence des voies efférentes, du ventricule droit et hypoplasie du tissu atrial (oreillettes).

OCT1 constitue également l'un des facteurs capable de moduler l'expression d'*Isl1* en interagissant avec un élément de réponse de séquence ATGATAAT situé à -116/-109 (-188/-181 selon la numérotation des auteurs qui ont défini expérimentalement un site d'initiation de la transcription à +70). Des mutations de deux bases dans ce motif sont suffisantes pour abolir l'activité du promoteur dans la lignée cardiaque P19CL6 (Liu et al, 2010). Les auteurs peuvent induire la différenciation de ces cellules en les traitant par du DMSO. Dans ces conditions, on observe une sensible augmentation du recrutement d'OCT1 sur le promoteur d'*Isl1* après 4 jours de traitement. L'inactivation d'OCT1 par des ARN anti-sens prévient partiellement la différenciation de ces cellules et diminue l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la cardiogénèse dont *Isl1*. Enfin, *Isl1* et *Oct1* s'expriment dans les mêmes structures au cours du développement cardiaque, notamment les voies efférentes et les ventricules. L'ensemble de ces données suggère qu'OCT1 est déterminant dans l'expression d'*Isl1* et dans les processus de différenciation du myocarde où cette protéine LIM-HD intervient.

4.1.2 Eléments régulateurs présents au locus d'*Isl1*

Contrairement au gène du *Gnrhr* qui est cerné par des gènes situés de part et d'autre de son locus, à seulement 10 kb en 3' et 30 kb en 5', *Isl1* se situe dans une sorte de désert génique, les gènes bien caractérisés les plus proches se situant à 200 kb en 3' et 300 kb en 5'.

C'est sans doute ce qui a conduit Kang et al (2009) à explorer le locus d'*Isl1* sur 300 kb de part et d'autre du gène à la recherche de régions hautement conservées et donc potentiellement régulatrices. Ils en ont identifiées une dizaine et étudié plus particulièrement l'une d'entre elle située à 3 kb en aval du codon de terminaison. Cette région, associée au gène rapporteur *LacZ* lui-même fusionné au promoteur minimal de *Hsp68* est capable de se comporter comme un enhancer tissulaire spécifique des structures dérivées du second champ cardiaque. Ces études ont été réalisées par transgénèse transitoire et donc par l'analyse d'embryons de souris issus directement d'ovocytes injectés par les constructions *LacZ*. Dans ces conditions, l'enhancer est notamment capable de cibler l'expression du gène rapporteur à E9 dans le mésoderme pharyngal, le ventricule droit et les voies efférentes. L'expression de la β -galactosidase est également co-localisée avec celle d'ISL1, démontrant la fonction régulatrice de cet enhancer dans la différenciation des structures dérivées du second champ cardiaque. L'analyse plus précise de cette région par génomique fonctionnelle révèle trois régions plus fortement conservées capables de lier *in vitro* des facteurs de type Forkhead, suggérant que l'expression d'*Isl1* et sa fonction dans la cardiogénèse sont contrôlées en amont par des facteurs appartenant à cette famille. Des expériences complémentaires réalisées *in vitro* suggèrent l'implication de FOXF1, FOXA1 et FOXC2 comme les candidats les plus probables. La même année et par une approche très semblable de génomique fonctionnelle, Kappen et Salbaum (2009) ont identifié ce même enhancer comprenant 3 régions hautement conservées chez l'homme, la souris et le poulet. Comme dans les expériences précédentes, cet enhancer est capable *in vivo* de cibler l'expression d'un gène rapporteur dans les structures dérivées du second champ cardiaque. Expérimentalement, par transfection transitoire, ils montrent qu'outre un facteur Forkhead, FOXO1, le facteur GATA4 est capable de transactiver une construction contenant cet enhancer. La famille des facteurs GATA se pose ainsi comme une alternative aux facteurs Forkhead dans le contrôle de l'expression d'*Isl1* au cours du développement cardiaque.

Dans le même article, ces auteurs ont également commencé à identifier d'autres régions régulatrices capables de cibler l'expression d'*Isl1* cette fois-ci dans les cellules pancréatiques. Ils ont ainsi testé plus de 200 constructions comprenant des fragments d'environ 10 kb recouvrant environ 200 kb du locus d'*Isl1* par transfection transitoire dans 3 lignées cellulaires représentatives des cellules pancréatiques α productrices de glucagon, des

cellules β productrices d'insuline et des cellules δ productrices de somatostatine. Les données obtenues démontrent que les 13 constructions actives, réparties sur les 200 kb du locus testées sont chacune spécifiques d'un ou, plus rarement, de deux types cellulaires, jamais des trois à la fois. Ce criblage extensif du locus d'*Isl1* est assez prometteur mais l'information qu'il procure reste encore limitée, notamment concernant la nature des facteurs de transcription impliqués. Néanmoins, ce travail illustre de façon assez remarquable la dispersion considérable (160 kb entre les deux plus extrêmes) et assez inattendue des séquences régulatrices au sein du locus d'*Isl1*.

La génomique fonctionnelle a également été mise à contribution pour identifier des séquences régulatrices ciblant l'expression d'*Isl1* dans les neurones moteurs et sensitifs de la moelle épinière au cours de l'ontogenèse chez les Vertébrés. En utilisant d'abord comme modèle le poisson zèbre et comme technologie la transgénèse, deux séquences de 800 et 600 bp, dénommées CREST (conserved regulatory element of the *Isl1* gene) 1 et 2, situées à 23 et 56 kb en aval de *Isl1* chez le poisson zèbre ont été caractérisées sur leurs propriétés à diriger l'expression de la GFP dans les neurones moteurs craniaux et dans les neurones primaires (Uemura et al, 2005). L'analyse plus précise des profils d'expression du transgène au cours du développement a mis en évidence le parallélisme entre les structures marquées chez le poisson et celles exprimant *Isl1* chez la souris et le poulet suggérant des mécanismes conservés au sein des Vertébrés. L'étude par génomique comparative a révélé des séquences très homologues chez la souris, le poulet et l'homme, ciblant l'expression de la GFP dans les neurones moteurs adéquats de la moelle épinière. Une troisième séquence conservée a finalement été identifiée, cette fois spécifique des neurones sensitifs. Cette séquence réside à environ 320 kb en amont d'*Isl1* chez l'homme et la souris alors qu'elle n'est distante que de 60 kb chez le poisson.

L'ensemble de ces données suggère fortement que la séquence de 5 kb en amont du site d'initiation de la transcription, le promoteur dit proximal, comparé aux éléments très distaux (jusqu'à 350 kb chez l'homme) décrit ci-dessus n'aurait qu'une importance relativement minime dans l'expression tissulaire d'*Isl1* comme nous avons pu le constater par transfection transitoire. Néanmoins, l'existence d'un élément de réponse à OCT1 (cf. 4.1.1), et probablement OCT2, est une piste à ne pas négliger, compte tenu de la présence de ces deux facteurs dans les cellules gonadotropes et de leur rôle dans

l'expression tissulaire du *Gnrhr* (Schang et al, 2012). En parallèle, un projet de génomique fonctionnelle est actuellement mis en œuvre au laboratoire pour identifier des séquences conservées qui seraient impliquées dans l'expression hypophysaire d'*Isl1*.

4.2 Rôles des régulations épigénétiques dans l'expression d'*Isl1*

4.2.1 Structure des promoteurs

La 5-méthyl cytosine présente une forte analogie de structure avec la thymine ce qui en fait un site très sensible de mutation par transversion, les 5-méthyl cytosines étant transformées en thymine par déamination. Ces 5-méthyl cytosines se situent au sein des dinucléotides CpG chez les animaux alors qu'elles peuvent être présentes également sur d'autres séquences, notamment trinuécléotidiques, dans le monde végétal. Par ce biais, au cours de l'évolution, les zones méthylées des génomes se sont progressivement enrichies en adénines et en thymines au détriment des cytosines et des guanines, les dinucléotides CG étant transformés en TG ou CA suivant le brin sens ou antisens ayant subi la transversion. Il subsiste néanmoins dans les génomes des zones riches en C et G, présentant de nombreux sites potentiels de méthylation, les dinucléotides CpG. Ces îlots CpG, ainsi qu'on les définit, seraient protégés de la méthylation expliquant, partiellement, leur pérennité.

Lorsque l'on considère les gènes codant les protéines, les séquences régulatrices pilotant ces gènes comportent un promoteur minimal essentiel ou « core promoter », une séquence d'ADN relativement courte d'une taille de 60 à 150 pb portant des éléments capables de recruter l'ensemble des facteurs généraux de transcription, notamment TFIID, et l'ARN polymérase II (ARN Pol II). Ce promoteur minimal a, par lui-même, peu ou pas d'activité mais il est indispensable à l'activité transcriptionnelle. A cette séquence sont associés des éléments cis-régulateurs, enhancers ou silencers, liant des facteurs activateurs ou répresseurs. Ces facteurs de transcription recrutent des coactivateurs ou des corépresseurs qui, à leur tour, modulent la transcription dépendante de l'ARN Pol II *via* le promoteur minimal. Ces éléments cis-régulateurs, avec le promoteur minimal, constituent le promoteur fonctionnel. Ils peuvent se situer aussi bien à proximité du promoteur minimal essentiel qu'à

de très longues distances se mesurant en dizaines ou centaines de Kb (cf. 4.1.2). De plus, au-delà des facteurs de transcription qui interagissent avec ces éléments cis-régulateurs, des modifications épigénétiques telle que la méthylation de l'ADN sur des dinucléotides CpG et/ou les modifications des histones régulent l'activité du promoteur. Récemment, il s'est avéré que la séquence d'ADN, notamment celle du promoteur, était impliquée dans l'établissement de ses propres profils de méthylation et dans le positionnement des marques d'activité et d'inactivité portées par les histones (Wilson et al, 2008 ; Lienert et al, 2011).

Classiquement, on distingue deux classes de promoteurs minimaux essentiels : les promoteurs possédant une boîte TATA (séquence consensus TATAA ou TATAWAAR) qui permet de positionner l'initiation de la transcription de manière très précise entre 28 et 31 paires de bases de ce motif (focused core promoters) (Juven-Gershon et al, 2008). Cette boîte TATA est souvent associée à d'autres motifs tels que la séquence initiatrice (Inr, consensus YYANWYY) qui recouvre le site unique de transcription. Un promoteur typique de ce type arbore une séquence riche en T et A, dirige l'expression de gènes d'expression tissulaire spécifique et possède des motifs CpG méthylés dans les tissus où les gènes correspondants ne s'expriment pas. Exemple : le gène codant la prolactine. Contrairement à l'idée reçue, cette classe de promoteurs pilote moins de 30 % des gènes. La deuxième classe, la plus abondante, comprend les promoteurs sans boîte TATA, avec comme conséquence plusieurs sites d'initiation de la transcription répartis sur une centaine de paires de bases (dispersed core promoters). Ils sont riches en C et G, présentant un îlot CpG englobant les sites d'initiation de transcription et s'étendant sur plus de 200 pb. Ces promoteurs dirigent l'expression des gènes dits de ménage, exprimés dans la plupart des cellules de l'organisme, les îlots CpG étant préservés de la méthylation. Entre ces deux classes extrêmes, se décline toute une gamme de promoteurs possédant des caractéristiques intermédiaires, notamment le promoteur du *Gnrhr*. Il est caractérisé par une richesse en T et A, ne possède pas de boîte TATA et, par voie de conséquence, présente plusieurs sites d'initiation de transcription.

Nous avons choisi de comparer les promoteurs des gènes de la sous-unité alpha (*Cga*) et de la LH β (*Lhb*), de la FSH β (*Fshb*), de la prolactine (*Prl*) et de la pro-opiomélanocortine (*Pomc*) comme représentants supposés de la première classe (TATA box containing promoters with tissue-specific gene expression) et un gène d'expression ubiquiste, HPRT,

comme représentant de la seconde classe (TATA-less promoters directing the expression of housekeeping genes). Ces gènes nous ont servi de références pour l'analyse des deux cas typiques qui apparaissent régulés l'un essentiellement sous le contrôle d'une combinatoire de facteurs de transcription, le *Gnrhr*, et l'autre *via* d'autres mécanismes que nous supposons épigénétiques, *Isl1*.

Dans les expériences de transfection transitoire, les promoteurs transfectés échappent aux régulations épigénétiques qui affectent le promoteur endogène. Ces promoteurs qui dirigent l'expression d'un gène rapporteur ne sont pas méthylés et, au moins au cours des premières 48 heures, subsistent en dehors de toute structure chromatinienne. Les régulations observées sur le gène rapporteur sont donc, *a priori*, exclusivement dues aux facteurs de transcription présents dans la cellule transfectée. A l'inverse, le promoteur endogène est soumis à l'action des DNA méthyltransférases et se situe dans une structure chromatinienne qui peut être affectée de toutes sortes de modifications, acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitination des histones. A l'action des facteurs de transcription se superpose donc toute une série de régulations épigénétiques potentielles. La comparaison des activités des promoteurs transfectés et endogènes peut ainsi permettre d'évaluer la part respective des modulations génétiques (facteurs de transcription) et épigénétiques (méthylation de l'ADN et modifications des histones). L'un de nos objectifs consistait à déterminer si l'architecture des promoteurs minimaux essentiels peut définir l'importance relative des modulations génétiques et épigénétiques.

4.2.2 Modifications des histones

A ce titre, il est important de souligner que cette hypothèse est déjà partiellement démontrée par l'établissement de cartes à grande échelle de plusieurs marques de modification des histones, notamment K4Me3 et K27Me3 (Mikkelsen et al, 2007). Ces cartes qui rapportent la densité de ces marques pour l'ensemble des promoteurs du génome murin ont été établies et comparées dans trois types cellulaires : des cellules pluripotentes, en l'occurrence des cellules souches murines et deux types cellulaires déjà déterminés, l'un constitué de cellules progénitrices neuronales (neuroblastes) et l'autre de fibroblastes embryonnaires (stade E13.5). De cette analyse il ressort deux classes de promoteurs, ceux à haut contenu en

dinucléotides CpG qui exhibent majoritairement des marques d'activité et d'inactivité (K4Me3 et K27Me3), jusqu'à 100% de ces promoteurs dans les cellules pluripotentes, et ceux à faible contenu en CpG qui sont marqués de manière très minoritaire soit 1,5 à 2,6% dans les neuroblastes et les fibroblastes. Les promoteurs intermédiaires présentant un taux de CpG moyen se classent entre ces deux extrêmes. Il est souligné que parmi les promoteurs à faible contenu en CpG, les promoteurs dirigeant l'expression de gènes très spécifiques d'un tissu sont ceux majoritairement marqués.

4.2.2.1 *L'expression d'Isl1 et celle du Gnrhr sont essentiellement corrélées avec les marques K4Me3 et K27Me3*

L'analyse que nous avons réalisée recouvre assez bien ces conclusions. *Hprt*, typique des promoteurs à haut contenu en CpG, contient la marque d'activité K4Me3 dans toutes les lignées à l'exception des cellules GH3B6 où ce promoteur est exceptionnellement réprimé (Melmed, 1982). Dans ce cas précis, il exhibe la marque K27Me3. Les gènes de la *Prl* et de la *Pomc*, en tant que gènes d'expression tissulaire spécifique et restreinte exhibent également la marque d'activité K4Me3 dans leur lignée respective, comme attendu. Concernant *Isl1*, les résultats obtenus montrent que ce gène, comme les précédents, obéit au code histone méthylée. La marque d'activité K4Me3 est présente majoritairement dans les trois lignées qui expriment les ARN messagers d'*Isl1*, les deux lignées gonadotropes, α T3-1 et L β T2, et la lignée de neurones hypothalamique GT1-7. A l'inverse, dans les lignées lacto-somatotrope et corticotrope, c'est la marque d'inactivité, K27Me3, qui est majoritairement représentée. Ces modifications épigénétiques, K4Me3 et K27Me3, à travers le recrutement de différents effecteurs comme nous le verrons plus loin, constituent donc une partie des mécanismes moléculaires qui dirigent ou restreignent l'expression d'*Isl1* dans ces lignées représentatives des types cellulaires hypophysaires. Il est intéressant de constater que le *Gnrhr* obéit au même code histone méthylée qu'*Isl1* à une exception près : le contexte cellulaire des cellules GT1-7. Dans ce cas particulier, aucune des deux marques n'est détectée en PCR quantitative mais les résultats de PCR semi-quantitative suggèrent la présence majoritaire de la marque K4Me3 alors qu'aucune activité du promoteur n'est détectée et que le niveau des ARNm du *Gnrhr* reste sous le seuil de détection en PCR quantitative. Certaines données de la littérature font état de la présence du récepteur et des transcrits correspondants dans cette lignée cellulaire.

(Krsmanovic et al, 1993 ; Krsmanovic et al, 1999 ; Ishii et al, 2009) Ces cellules expriment aussi le GnRH lui-même ce qui permettrait la mise en place d'une boucle autocrine de régulation du récepteur par son propre ligand (Krsmanovic et al, 1999). Il est probable que, sous certaines conditions, ces cellules expriment le *Gnrhr*. Par ailleurs, malgré le contrôle strict déjà mis en place *via* les facteurs de transcription, les marques d'activité et d'inactivité sont présentes, démontrant que ces deux mécanismes de contrôle, génétiques et épigénétiques, ne sont pas exclusifs dans le cas du *Gnrhr*. Ce gène est riche en T et A et présente également une fréquence de dinucléotides CpG relativement élevée, la plus forte comparée à *Lhb*, *Fshb*, *Cga*, *Prl*, et *Pomc* mais plus faible que celle d'*Isl1* ou d'*Hprt*. On peut donc le classer dans les gènes comportant un promoteur de classe intermédiaire entre ceux à fort taux de CpG (*Isl1* ou *Hprt*) et ceux à faible taux (*Prl*). Ces promoteurs ne sont pas majoritairement porteurs de ces marques de méthylation contrairement aux promoteurs à fort taux de CpG (Mikkelsen et al, 2007). Malgré son statut intermédiaire, le promoteur du *Gnrhr* porte donc ces marques. Enfin, les gènes *Cga*, *Lhb* et *Fshb* dans les deux lignées gonadotropes portent les marques K4Me3 et K27Me3 qui reflètent leur état de différenciation respectif et le taux d'expression des gènes : K4Me3 pour *Cga* dans les deux lignées, plutôt K4Me3 et définitivement K27Me3 pour *Lhb* respectivement dans les cellules LβT2 et αT3-1, et K27Me3 pour *Fshb* dans les deux lignées. L'expression de *Fshb* n'est détectée qu'en présence d'activine dans les cellules LβT2 et dans les conditions non stimulées le gène est probablement réprimé, comme le suggèrent nos résultats.

Il est à noter que nous n'avons pas observé de corrélation évidente entre acétylation des histones et expression des gènes, quel que soit le gène considéré. Nous n'avons pas non plus observé de corrélation entre les deux anticorps anti-acetyl-histone H3K9K14 et anti-acetyl-histone H3K14 alors que ces deux anticorps reconnaissent au moins une marque commune (acetyl K14). Il sera nécessaire de répéter ces expériences pour valider ou invalider ces résultats. Dans la suite de cette discussion, nous concentrerons notre réflexion sur les deux autres marques, K4Me3 et K27Me3.

4.2.2.2 *Rôles des marqueurs, effaceurs et effecteurs des modifications d'histones*

Le profil d'expression des gènes à homéoboîte chez la drosophile est défini très tôt au cours de l'embryogenèse par des facteurs d'origine maternelle ou zygotique qui disparaissent aux stades ultérieurs de développement. Le profil d'expression de ces gènes est alors préservé par les complexes Polycomb et Trithorax, répresseur et activateur de la transcription, qui constituent la mémoire cellulaire des événements développementaux précoces. Ce mode de régulation s'est avéré très largement répandu au-delà des gènes HOX et directement lié aux modifications épigénétiques.

L'une des questions majeures que soulève ce mémoire concerne les mécanismes qui sont susceptibles de connecter les marques d'activité K4Me3 et d'inactivité K27Me3 avec l'expression des gènes. D'un point de vue général, et ceci est vrai chez la levure comme chez l'homme, plusieurs complexes enzymatiques participent à la mise en place (marqueurs - writers) ou au retrait (effaceur – eraser) des marques d'activation K4Me3 et d'inactivation K27Me3. Une fois ces marques positionnées, la présence ou l'absence de celles-ci se traduit par le recrutement de différents effecteurs capables de remodeler la structure chromatinienne par repositionnement ou éviction des nucléosomes. Certains sont aussi liés à la méthylation ou à la déméthylation de l'ADN. Comme nous l'avons déjà souligné dans l'introduction (cf. paragraphe 1.6.1.1), les modifications K27Me3 et K4Me3 sont associées à deux complexes multiprotéiques majeurs, respectivement le complexe ou groupe Polycomb (PcG) et le complexe ou groupe Trithorax (TrxG). Chez la drosophile, les complexes PcG et TrxG interagissent avec la chromatine sur des éléments de réponse Polycomb et Trithorax (PRE et TRE) non pas directement mais par l'intermédiaire de plusieurs facteurs de transcription. Ces éléments s'étendent sur plusieurs centaines de pb et présentent plusieurs motifs pour différents facteurs de transcription, capables d'interagir avec PcG et /ou TrxG. Des éléments de réponse homologues ont été également identifiés chez les Mammifères dont certains impliquent notamment le facteur de transcription Yin-Yang 1 (Sing et al, 2009 ; Woo et al, 2010 ; Cuddapah et al, 2012).

Les PcG et TrxG regroupent en un seul complexe à la fois les marqueurs, les effaceurs et les lecteurs des modifications d'histones. Ils participent à la mise en place ou à l'effacement

de ces marques comme au remodelage chromatinien qu'elles codent. Néanmoins, les protéines responsables de ces différentes actions agiraient de manière coopérative rendant assez complexe leur identification. Concernant PcG, il se subdivise en deux complexes répresseurs bien identifiés, PRC1 et PRC2 (Boyer et, 2006). Nous réduirons notre analyse à ces deux groupes de protéines bien que plusieurs autres complexes apparentés aient été identifiés (Simon et Kingston, 2009).

Dans les cellules souches murines embryonnaires, une première étude a démontré que ces deux complexes répresseurs ciblent plus de 500 gènes dont de nombreux facteurs de transcription à homéodomaine impliqués dans les processus de différenciation de plusieurs tissus (Boyer et al, 2006) et parmi ceux-ci plusieurs protéines LIM-HD comme *Isl2*. Il apparaît que la marque K27Me3 est plus particulièrement associée à PRC2. Celui-ci contient en effet deux histones méthyltransférases à domaine SET (acronyme des 3 protéines de levure qui ont défini ce domaine), des marqueurs donc, spécifiques de H3K27 et nommées EZH (Enhancer of Zest homologue) 1 et 2. EZH2 serait impliquée dans la méthylation de novo et EZH1 dans la restauration de cette marque lors d'échanges nucléosomiques ou de déméthylation (Margueron et Reinberg, 2011). EZH1 serait également impliquée dans le compactage des nucléosomes. Elle posséderait à la fois une activité catalytique méthyltransférase et une activité de remodelage de la chromatine (Simon et Kingston, 2009).

Plusieurs autres partenaires interviennent au sein de ce complexe et participent à son activité répresseur, en modulant l'activité enzymatique et la liaison à l'ADN. La marque K27Me3 est souvent associée à la présence de la RNA Pol II phosphorylée sur la Ser5 c'est-à-dire la RNA Pol II active au site d'initiation de la transcription comme nous l'avons nous-mêmes observée à plusieurs reprises. Néanmoins, le niveau de transcription de ces gènes présentant à la fois la RNA Pol II et la marque K27Me3 est faible suggérant que la RNA Pol II est en pause, bloquée à proximité du site d'initiation. Les ARN transcrits de faible taille et encore attachés à la RNA Pol II participeraient aussi au recrutement de PRC2 (Margueron et Reinberg, 2011). Dans la moitié des cas, les promoteurs ayant recrutés PRC2 recrutent également, *via* l'histone H3K27Me3, le complexe PRC1 qui, à son tour, catalyse l'ubiquitinylation de l'histone H2A sur la Lys 119 avec pour conséquence le blocage de l'élongation par la RNA Pol II.

Le complexe PRC1 est formé de 4 protéines, que ce soit chez la drosophile ou l'humain, qui forment le cœur de ce complexe, un complexe stable et fonctionnel capable de réprimer la transcription, d'inhiber le remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP – induit par TrxG – et de compacter les nucléosomes. En fait, comme PRC2, PRC1 présente différentes composition en protéines suivant les tissus ou les gènes considérés et doit plutôt être regardé comme une famille de complexes possédant deux activités essentielles : compactage de la chromatine et ubiquitinylation de l'histone H2A (Simon et Kingston, 2009). Le compactage de la chromatine est assuré par un premier complexe, formellement anciennement défini comme PRC1 (chez l'homme) comprenant les protéines RING1B (ou RNF2), CBX4 (Chromobox protein homologue 4), BMI1 (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1), et PH1 (Polyhomeotic 1) tandis que l'ubiquitinylation de l'histone H2A est assuré par un second complexe BCOR comprenant RING1, RING1B, NSPC1 (nervous system Polycomb 1), BCOR (BCL6 corepressor qui a donné son nom au complexe) et KDM2 (Lysine demethylase 2). Cette dernière peut à la fois déméthyliser K36Me2 (marque d'activité) et stimuler l'ubiquitinylation.

A ces complexes répresseurs s'oppose le complexe activateur TrxG associé à la marque d'activité K4Me3. Dans les cellules souches murines ou humaines les $\frac{3}{4}$ des promoteurs connus sont marqués par K4Me3 (Ku et al, 2008). Comme dans le cas des complexes PcG, les protéines composant le complexe TrxG sont diverses et nombreuses. Elles peuvent être subdivisées selon leur fonction moléculaire en trois classes (Schuettengruber et al, 2011) :

- les histones méthyltransférases à domaine SET (Su(var)3-9 enhancer of Zeste Trithorax). Ce domaine SET d'environ 130 amino acides confère l'activité catalytique méthyltransférase à plusieurs protéines associées à la chromatine qu'elles appartiennent à PcG ou à TrxG.

- les protéines capables de remodeler la chromatine de manière dépendante de l'ATP. Ces facteurs en outre sont capables de reconnaître les marques de méthylation laissées par les facteurs à domaine SET.

- les protéines capables de reconnaître des motifs ADN, de modifier les histones et remodeler la chromatine ainsi que d'autres protéines n'appartenant pas aux deux classes précédentes.

Dans la première classe, on trouve chez les Mammifères les MLLs (mixed lineage leukemia), des H3K4 méthyltransférases qui se lient à l'ADN et soit ciblent spécifiquement des familles de gènes, telles que les gènes *Hox* ou les gènes régulés par les acides rétinoïques soit agissent plus globalement. Les MLL1 et 2 se lient à l'ADN par reconnaissance des séquences CpG non méthylées. Les remodeleurs de la chromatine agissent par interaction avec les histones, en faisant glisser les nucléosomes le long de l'ADN ou en provoquant leur éviction. Les remodeleurs possèdent des domaines protéiques spécifiques qui leur permettent de reconnaître différentes modifications d'histone. Ainsi SMARCA2 (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2) reconnaît les histones acétylées *via* son bromodomaine tandis que CHD1 (chromodomain helicase DNA-binding protein-1) décrypte la marque K4Me3 *via* son chromodomaine. CHD8 reconnaît à la fois K4Me3 et K4Me2 *via* le même domaine. Certaines possèdent également des activités histone désacétylase (CHD3 et 4).

4.2.3 La diversité des complexes répresseurs et activateurs implique une diversité des régulations.

Les données concernant les complexes Pc et Trx illustrent très clairement que les deux marques K27Me3 et K4Me3 peuvent recruter des assemblages protéiques très différents suivant les gènes ou familles de gènes. Si l'on considère *Isl1*, en tant que gène impliqué dans le développement, il est très probable que K27Me3 recrute PRC2. Devraient être présentes au locus d'*Isl1* dans les lignées ISL1 négatives les histones méthyltransférases EZH1 et EZH2. Pour déterminer si PRC1 est également recruté, il faudrait tester l'ubiquitinylation de l'histone H2A et comparer ces données avec celles obtenues au locus *Gnrhr*. La situation pourrait être encore plus complexe dans les lignées exprimant *Isl1* et le *Gnrhr*. La marque K4Me3 recouvre encore une plus grande complexité. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse qu'*Isl1* recrute *via* K4Me3 des effecteurs différents de ceux recrutés par le *Gnrhr*. En ce sens les études de méthylation de l'ADN peuvent apporter un éclairage intéressant.

4.2.3.1 *Couplage moléculaire entre méthylation de l'ADN et des histones.*

Il est paradoxal de souligner que la drosophile "*Drosophila Melanogaster*", à l'origine de la découverte des complexes Trx et Pc, ne dispose pas du système de modification de l'ADN qui, chez les Vertébrés et plus particulièrement les Mammifères, semble fonctionnellement couplé à la méthylation des histones. La levure "*Saccharomyces cerevisiae*", autre modèle phare en biologie ne possède pas non plus de système de modification de l'ADN. Pourtant, chez les Mammifères, l'inactivation de l'ADN méthyltransférases (Dnmt1) est létale tôt au cours du développement, illustrant l'importance de ce système de modification (Li et al, 1992).

Nous avons réalisé une première analyse du profil de méthylation du promoteur d'*Isl1* dans les 5 lignées cellulaires exprimant (α T3-1, L β T2 et GT1-7) ou n'exprimant pas *ISL1* (GH3B6 et AtT20). Cette analyse recouvre seulement 1500 pb du promoteur, incluant l'îlot CpG. Il s'avère que le promoteur est non méthylé sur la région la plus proximale (+100/-568) dans les lignées qui expriment *Isl1* et partiellement méthylé au-delà. Dans les deux lignées qui n'expriment pas *Isl1*, la méthylation recouvre complètement le promoteur, incluant l'îlot CpG (lignée GH3B6) ou l'excluant (lignée AtT20). Ces données sont encore préliminaires et seront vérifiées par séquençage après traitement de l'ADN au bisulfite de sodium. Néanmoins, elles se corrélaient assez bien avec la présence des marques d'activité de la chromatine et avec les données de la littérature. Généralement, dans les tissus sains, les îlots CpG sont préservés de la méthylation et c'est ce que l'on observe ici dans 4 cas sur 5, bien que toutes ces lignées soient d'origine tumorale, obtenues par oncogénèse ciblée ou après irradiation ou traitement hormonal. La répression de la transcription serait donc essentiellement liée à la méthylation des CpG localisés en amont de l'îlot CpG.

Les liens entre méthylation de l'ADN et la présence de la marque d'inactivité K27Me3 sont loin d'être manifestes (Hashimoto et al, 2010). Néanmoins, des travaux récents suggèrent que les promoteurs se répartiraient grossièrement en deux groupes, ceux à la fois méthylés et porteur de la marque K27Me3 et ceux non méthylés ou peu méthylés et malgré tout marqués (Statham et al, 2012). Ainsi l'histone méthyltransférase spécifique de H3K27, EZH2 (Enhancer of Zest homolog 2) est capable de recruter des DNA méthyltransférases sans

pourtant provoquer de méthylation *de novo* de l'ADN, tout au moins dans des conditions physiologiques normales. Dans certains cas pathologiques, les gènes suppresseurs de tumeurs sont souvent hyperméthylés sur les îlots CpG et ceci est corrélé avec la présence de H3K27Me3 sur ces mêmes gènes dans les tissus sains (Schlesinger et al, 2007). Le pré-marquage des gènes par H3K27Me3 dans les tissus sains serait un préalable à l'hyperméthylation de l'ADN dans les tumeurs développées par ces tissus. Néanmoins, la présence de l'histone méthyltransférase associée, EZH2, n'est pas suffisante pour induire la méthylation des CpG.

A l'inverse, la corrélation entre la présence de K4Me3 et l'absence de méthylation de l'ADN, comme la situation inverse, sont beaucoup mieux argumentées (Mikkelsen et al, 2007 ; Thomson et al, 2010 ; Hashimoto et al, 2010 ; Laurent et al, 2010 ; Portela et Esteller, 2010).

La méthylation de l'ADN est établie et maintenue par diverses familles d'enzymes dont les DNA méthyltransférases qui se répartissent en deux groupes : les méthyltransférases *de novo*, DNMT3a et DNMT3b, et les méthyltransférases de maintenance comme DNMT1. La DNMT3L est quant à elle un facteur régulateur sans activité catalytique. Des domaines protéiques très conservés favorisent les interactions entre les histones et l'ADN : le domaine ADD (ATRX-DNMT3-DNMT3L), le domaine CXXC (Cys-X-X-Cys) et le domaine MBD (Méthyle-CpG-Binding). Ainsi, DNMT3L interagit spécifiquement *via* son domaine ADD avec la région N terminale de l'histone H3 lorsque K4 n'est pas méthylé. Il agit comme un senseur de l'absence de méthylation de H3K4 et induit des méthylations *de novo* via le recrutement de DNMT3a au nucléosome (Ooi et al, 2007 ; Zhang et al, 2010 ; Franklin et Mansuy, 2010 ; Hashimoto et al, 2010). Certains de ces domaines, comme le domaine CXXC, sont présents à la fois au sein des DNA et des histones méthyltransférases. DNMT1, qui est abondamment présente en phase S du cycle cellulaire, contient un domaine CXXC permettant que le profil de méthylation de l'ADN soit fidèlement préservé dans les cellules en division (Portela et Esteller, 2010 ; Hashimoto et al, 2010). Les histones lysine méthyltransférases spécifiques de H3K4 de la famille MLL possèdent également un domaine CXXC et reconnaissent les CpG non méthylés. Elles sont impliquées dans la méthylation de H3K4 située sur les promoteurs de gènes riches en CpG et préviennent l'apparition de

méthylation *de novo*, stabilisant l'ADN non méthylé (Cosgrove et al, 2010 ; Thomson et al, 2010 ; Hashimoto et al, 2010 ; Cierpicki et al, 2010).

Dans les lignées GH3B6 et AtT20 qui n'expriment pas *Isl1*, la méthylation des CpG en amont de l'îlot CpG est corrélée avec le faible taux de méthylation de H3K4 (pour revue Deaton et Bird, 2011 ; Llamas et al, 2012). Au cours du cycle cellulaire, DNMT1 devrait être recrutée au promoteur d'*Isl1* dans ces cellules pendant la phase S du cycle cellulaire. Ce point pourrait être validé ou invalidé par des expériences de ChIP sur cellules synchronisées. Le recrutement des facteurs de transcription (type SP1) devrait être simultanément inhibé. Inversement, dans les lignées gonadotropes, il serait intéressant de déterminer la nature des histones lysine méthyltransférases spécifiques de H3K4 qui sont recrutées au promoteur d'*Isl1*, 8 d'entre elles étant déjà connues chez l'homme, et comparer à celles présentes sur le promoteur du *Gnrhr*. A terme, il serait assez captivant de déterminer la localisation de ces protéines lors de la différenciation des cellules gonadotropes au cours du développement hypophysaire dans les périodes les plus précoces au stade où *Isl1* s'exprime dans toutes les cellules progénitrices puis lorsque son expression se restreint aux cellules situées dans la partie ventrale. Vers 13,5 jours de développement, c'est le gène codant le GnRHR qui commence à s'exprimer. Décrypter les mécanismes épigénétiques sous-jacents constituerait une avancée certaine. ISL1 ou d'autres facteurs de transcription pourraient être directement impliqués dans la mise en place des modifications épigénétiques qui très certainement accompagnent l'émergence de l'expression du *Gnrhr*.

4.2.3.2 *Les conséquences des régulations épigénétiques*

La méthylation de l'ADN modifie, via différents complexes protéiques, la position du nucléosome au site d'initiation de transcription. Ainsi l'incorporation des variants d'histones au sein des nucléosomes, notamment H2ZA, protège les gènes cibles contre la méthylation de l'ADN, et influence la transcription en régulant l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription et à la RNA polymérase II. La perte du nucléosome en 5' en amont du site d'initiation de transcription est fortement corrélée avec l'activation de la transcription, alors que sa présence est corrélée avec la répression de la transcription. (Fraga et al, 2005 ; Esteller,

2002-2008 ; pour revue Cairns, 2009 ; pour revue Portella et Esteller, 2010 ; pour revue Ho et al, 2010 ; Franklin et Mansuy, 2010).

La mise en place de profils épigénétiques anormaux contribue à l'émergence de pathologies comme les cancers, les maladies neurodéveloppementales, les maladies neurodégénératives et les maladies auto-immunes. La méthylation de l'ADN joue un rôle essentiel dans la régulation de la détermination du destin cellulaire des cellules souches neurales durant le développement embryonnaire, en particulier dans l'acquisition de la multipotence des cellules. Le développement du système nerveux est gouverné par des processus à étapes multiples dans lesquelles les cellules souches donneront naissance aux neurones et aux cellules gliales. Selon des études récentes, la méthylation de l'ADN joue un rôle clef dans la médiation des réponses cellulaires aux signaux endocriniens physiologiques. Des altérations du profil de méthylation de l'ADN contribueraient au développement de pathologies endocriniennes et métaboliques et pourraient expliquer la relation entre le fond génétique, l'environnement et les pathologies. En effet, les changements épigénétiques survenant durant l'embryogenèse auraient un impact sur les processus cellulaires durant la vie adulte suggérant que les fonctions endocriniennes chez l'adulte peuvent être affectées par des événements survenus au cours du développement embryonnaire et pendant l'enfance. Parmi les pathologies auto-immunes connues, les diabètes de type 1 et de type 2 présentent des aberrations de profils de méthylation des histones entraînant des altérations du positionnement du nucléosome, modifiant ainsi l'activité transcriptionnelle des gènes cibles. (Fukuda et Taga, 2005 ; Gleiberman et al, 2008 ; Vankelecom, 2010 ; pour revue Juliandi et al, 2010 ; pour revue Portella et Esteller, 2010 ; pour revue Teperek-Tkacz et al, 2011 ; pour revue Garcia-Carpizo et al, 2011). L'étude des régulations épigénétiques d'*Isl1*, facteur impliqué dans l'expression de plusieurs gènes d'importance comme ceux codant pour l'insuline ou le GnRHR, peut donc avoir des retombées physiologiques et physiopathologiques décisives.

5 Conclusion générale

Les données les plus récentes semblent suggérer que la séparation entre génétique et épigénétique soit très ténue. La séquence d'ADN serait suffisante non seulement pour fournir des éléments de réponse aux facteurs de transcription mais aussi pour programmer le positionnement des marques épigénétiques, modifications d'histones et méthylation de l'ADN (Lienert et al, 2011 ; Wilson et al, 2008). De plus, plusieurs facteurs de transcription sont susceptibles de former des frontières destinées à limiter la propagation de la méthylation de l'ADN, en particulier au niveau des îlots CpG, soulignant à nouveau l'importance de l'information génétique qui se situerait systématiquement en amont de l'épigénétique (Deaton et Bird, 2011 ; Bird, 2011). Par ailleurs, de nouveaux mécanismes de régulation ont été mis en évidence ces dernières années, mécanismes qui très probablement interviennent dans l'expression d'*Isl1* et du *Gnrhr*. Notamment, dans ce mémoire, nous n'avons pas envisagé les multiples aspects de la régulation par les ARN non codants, qui semblent jouer un rôle important dans l'établissement des marques épigénétiques. Ce point comme d'autres tels que la régulation par les miRNA et les séquences conservées (génomique fonctionnelle) font l'objet de différents projets au sein du laboratoire.

Le récepteur de la GnRH, la LH β et la FSH β s'expriment exclusivement dans le lignage gonadotrope au sein de l'hypophyse. C'est le cas de nombreux gènes dont l'expression est restreinte à un seul lignage cellulaire au sein d'un organe. Ces gènes d'expression tissulaire spécifique définissent ainsi le phénotype d'un lignage cellulaire différencié. L'expression de ces gènes est dirigée par des combinaisons de facteurs de transcription dont certains sont eux-mêmes d'expression tissulaire spécifique, le facteur stéroïdogénique SF1 dans le cas du lignage gonadotrope, PIT1 et TPIT pour les autres lignages hypophysaires. Les gènes codant pour ces facteurs de transcription s'expriment assez tardivement au cours du développement. Ils viennent compléter une combinatoire préexistante assurant l'expression spécifique et définitive des gènes marqueurs d'un lignage particulier. A l'opposé, d'autres facteurs s'expriment de façon précoce à un stade de développement où les cellules du futur organe sont encore indifférenciées et en prolifération. C'est non seulement le cas d'ISL1 dans l'hypophyse mais aussi de PITX1, PITX2, LHX3... L'expression de certains facteurs disparaît au cours des

stades ultérieurs du développement, HESX1 par exemple, tandis que d'autres facteurs vont continuer de s'exprimer chez l'adulte. Parmi ces facteurs certains s'expriment dans tous les types cellulaires différenciés de l'organe (PITX1 et 2) tandis que d'autre vont acquérir une expression spécifique d'un ou deux lignages. C'est semble-t-il le cas d'ISL1. Nous montrons ici que cette protéine LIM-HD n'est exprimée ni dans les cellules lacto-somatotropes ni dans les cellules corticotropes alors qu'elle est fortement exprimée dans les deux lignées gonadotropes. D'après les résultats que nous avons obtenus, on peut émettre l'hypothèse que dans les stades précoces de développement, l'expression d'Isl1 est assurée par des facteurs ubiquistes dans les cellules indifférenciées de la future hypophyse qui, à ce stade (E8, 5 chez la souris), n'est qu'une simple invagination de l'ectoderme oral. Par la suite, les gradients opposés de BMP2 et de FGF progressivement restreignent l'expression d'*Isl1* à la partie ventrale de l'hypophyse en développement. Il est probable qu'à ce stade de développement certaines marques épigénétiques se mettent en place, marque d'activité dans la partie ventrale et d'inactivité dans la partie dorsale. Le gradient ventrodorsal de BMP2 maintiendrait ou induirait le dépôt des marques d'activité au locus d'*Isl1* tandis que le gradient dorso-ventral de FGF provoquerait l'extinction d'Isl1 par le dépôt de marques d'inactivation dans la partie dorsale. BMP2 est effectivement capable d'induire un remodelage de la chromatine au promoteur de *Sox9*, un gène de développement, comme *Isl1*, et de même classe, puisque possédant un îlot CpG s'étendant sur les 600 pb du promoteur proximal (Pan et al, 2009).

A l'inverse, FGF2 est capable, sous certaines conditions de culture, d'induire l'extinction de la maspine, une protéine de la superfamille des serpins, en provoquant la méthylation du promoteur et des histones associées lors de la conversion des keratocytes de la cornée en fibroblastes (Horswill et al, 2008).

Un autre aspect des régulations géniques que nous n'avons pas soulevé concerne l'organisation spatiale de la chromatine dans le noyau. Ainsi, les complexes Pc et leurs protéines se regroupent dans le noyau en foyers concentrés nommés "Polycomb bodies". L'existence de ces corps Polycombs s'explique par la proximité physique de certains gènes co-réprimés comme les gènes *Hox* qui s'étendent sur le même chromosome à la suite les uns des autres de manière colinéaire et concentrent ainsi plusieurs complexes. Ceci s'explique également par la formation de boucles chromatiniennes qui regroupent des gènes très espacés

portant ces complexes Polycomb. Ces gènes peuvent être placés sur différents chromosomes, recrutés individuellement les complexes Polycomb et se retrouver au sein d'une même structure, concentrant ainsi ces complexes sous une forme détectable au microscope optique (Pirrotta et Li, 2012).

Le noyau présente ainsi plusieurs structures subnucléaires qui constituent de véritables sous-ensembles fonctionnels. Certaines d'entre elles pourraient constituer le pendant des corps Polycomb. Il s'agit notamment des amas de granules interchromatiniens (interchromatin granule clusters) (Spector et Lamond, 2011).

Ces amas nucléaires regroupent principalement des facteurs d'épissage des ARN. A la périphérie de ces amas se localisent des fibrilles périchromatiniennes constituées d'ARN en cours de synthèse, donc de gènes actifs. Une étude élégante réalisée par le groupe de Michael G. Rosenfeld montre qu'au cours de la stimulation par le sérum de la prolifération cellulaire des cellules HeLa, les locus des gènes qui contrôlent la croissance sont transloqués des corps Polycomb, un environnement répressif, aux amas de granules interchromatiniens, un milieu propice à l'activation des gènes. Deux ARNs non codants, *TUG1* et *NEAT2*, sont impliqués directement dans ce mécanisme (Yang et al, 2011).

Il serait possible de déterminer si *Isl1* au cours de l'ontogenèse hypophysaire change ainsi de compartiments subnucléaires. Il existe d'autres structures subnucléaires où se regroupent certains gènes co-exprimés et actifs. Ce sont les usines à transcription (transcription factories) différentes des fibrilles périchromatiniennes. Il serait intéressant de déterminer si *Isl1* et *Gnrhr* sont colocalisés ou non dans les mêmes compartiments subnucléaires.

L'architecture complexe des compartiments subnucléaires et plus généralement du noyau reflète finalement des modifications assez subtiles des histones et de l'ADN.

6 Bibliographie

A

- Ahlgren U, Pfaff SL, Jessell TM, Edlund T, Edlund H (1997)** Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature* 385: 257-60.
- Alarid ET, Windle JJ, Whyte DB, Mellon PL (1996)** immortalization of pituitary cells at discrete stages of development by directed oncogenesis in transgenic mice. *Development* 122: 3319-29
- Albarracin CT, Kaiser UB, Chin WW (1994)** Isolation and characterization of the 5'-flanking region of the mouse gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Endocrinology* 135: 2300-2306
- Albertson AJ, Navratil A, Mignot M, Dufourny L, Cherrington B, Skinner DC (2008a)** Immunoreactive GnRH type I receptors in the mouse and sheep brain. *J Chem Neuroanat* 35: 326-333
- Amoss M, Burgus R, Blackwell R, Vale W, Fellows R, Guillemin R (1971)** Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochem Biophys Res Commun* 44: 205-210
- Anderson L, McGregor A, Cook JV, Chilvers E, Eidne KA (1995)** Rapid desensitization of GnRH-stimulated intracellular signalling events in alpha T3-1 and HEK-293 cells expressing the GnRH receptor. *Endocrinology* 136: 5228-31
- Ando K, Shioda S, Handa H, Kataoka K (2003)** Isolation and characterization of an alternatively spliced variant of transcription factor Islet-1. *J Mol Endocrinol* 31: 419-25
- Arora KK, Chung HO, Catt KJ Alarid et al (1999)** Influence of a species-specific extracellular amino acid on expression and function of the human gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol Endocrinol* 13: 890-6
- Asa SL, Kovacs K, Laszlo FA, Domokos I, Ezrin C (1986)** Human fetal adenohypophysis Histologic and immunocytochemical analysis. *Neuroendocrinology* 43: 308-16

B

- Bach I, Rhodes SJ, Pearse RV 2nd, Heinzl T, Gloss B, Scully KM, Sawchenko PE, Rosenfeld MG (1995)** P-Lim, a LIM homeodomain factor, is expressed during pituitary organ and cell commitment and synergizes with Pit-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2720-4.
- Baldwin JM (1993)** The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J* 12: 1693-1703
- Ballesteros J, Kitanovic S, Guarnieri F, Davies P, Fromme BJ, Konvicka K, Chi L, Millar RP, Davidson JS, Weinstein H, Sealfon SC (1998)** Functional microdomains in G-protein-coupled receptors. The conserved arginine-cage motif in the gonadotropin-releasing hormone receptor *J Biol Chem* 273: 10445-10453
- Ballesteros, J, Palczewski K (2001)** G protein-coupled receptor drug discovery: Implications from the crystal structure of rhodopsin. *Curr Opin Drug Discov Devel* 4: 561-574
- Bancroft FC, Levine L, Tashjian AH Jr (1969)** Control of growth hormone production by a clonal strain of rat pituitary cells Stimulation by hydrocortisone. *J Cell Biol* 43: 432-41.
- Bannister AJ, Schneider R, Kouzarides T (2002)** Histone methylation: dynamic or static? *Cell* 109: 801-6. Review

- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K (2007)** High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129: 823-37
- Beauvillain JC (2008)** Le cerveau et la reproduction : le réseau neuronal à GnRH. *MT / médecine de la reproduction, gynécologie et endocrinologie* 10: 94-104
- Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E (1978)** Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypophyseal gonadotropin-releasing hormone. *Science* 202: 631-633
- Belsham DD, Evangelou A, Roy D, Duc VL, Brown TJ (1998)** Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression by 5 α -dihydrotestosterone in GnRH-secreting GT1-7 hypothalamic neurons. *Endocrinology* 139: 1108-1114
- Benard O, Naor Z, Seger R (2001)** Role of dynamin, Src, and Ras in the protein kinase C-mediated activation of ERK by gonadotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* 276: 4554-4563
- Benayoun BA, Caburet S, Dipietromaria A, Bailly-Bechet M, Batista F, Fellous M, Vaiman D, Veitia R (2008)** A. The identification and characterization of a FOXL2 response element provides insights into the pathogenesis of mutant alleles. *Hum Molec Genet.* 17: 3118-3127
- Benoît J, Assenmacher I (1952)** Influence of high and low lesions of the *infundibulum* on gonad stimulation in the domestic drake. *C R Hebd Seances Acad Sci* 235: 1547-1549
- Berger SL (2007)** The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447: 407-12. Review
- Bernstein BE, Kamal M, Lindblad-Toh K, Bekiranov S, Bailey DK, Huebert DJ, McMahon S, Karlsson EK, Kulbokas EJ 3rd (2005)** Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* 120: 169-81
- Bhati M, Lee C, Nancarrow AL, Lee M, Craig VJ, Bach I, Guss JM, Mackay JP, Matthews JM (2008)** Implementing the LIM code: the structural basis for cell type-specific assembly of LIM-homeodomain complexes. *EMBO J* 27: 2018-2029
- Bhutani N, Brady JJ, Damian M, Sacco A, Corbel SY, Blau HM (2010)** Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature* 463: 1042-7
- Bianco SD, Kaiser UB (2009)** The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Rev Endocrinol* 5: 569-76
- Bird A (2011)** Putting the DNA back into DNA methylation. *Nat Genet* 43: 1050-1
- Bird A (2002)** DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16: 6-21
- Black BL (2007)** Transcriptional pathways in second heart field development. *Semin Cell Dev Biol* 18: 67-76
- Blomenrohr M, Bogerd J, Leurs R, Schulz RW, Tensen CP, Zandbergen MA, Goos HJ (1997)** Differences in structure-function relations between nonmammalian and mammalian gonadotropin-releasing hormone receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 238: 517-522
- Boepple PA, Mansfield MJ, Crawford JD, Crigler JF Jr, Blizzard RM, Crowley WF Jr (1990)** Gonadotrophin-releasing hormone agonist treatment of central precocious puberty: an analysis of growth data in a developmental context. *Acta Paediatr Scand Suppl* 367: 38-43
- Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, Levine SS, Wernig M, Tajonar A, Ray MK, Bell GW, Otte AP, Vidal M, Gifford DK, Young RA, Jaenisch R (2006)** Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 441: 349-53
- Bramley TA, Menzies GS, Baird DT (1986)** Specificity of gonadotrophin-releasing hormone binding sites of the human corpus luteum: Comparison with receptors of rat pituitary gland. *J Endocrinol* 108: 323-328
- Briggs SD, Xiao T, Sun ZW, Caldwell JA, Shabanowitz J, Hunt DF, Allis CD, Strahl BD (2002)** Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature* 418: 498

Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S (2005) Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* 6: 826-35.

Buonassisi V, Sato G, Cohen Ai (1962) Hormone-producing cultures of adrenal and pituitary tumor origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48: 1184-90.

Burger LL, Dalkin AC, Aylor KW, Haisenleder DJ, Marshall JC (2002) GnRH pulse frequency modulation of gonadotropin subunit gene transcription in normal gonadotropes-assessment by primary transcript assay provides evidence for roles of GnRH and follistatin. *Endocrinology* 143: 3243-3249

Byrd KN, Shearn A (2003) ASH1, a Drosophila trithorax group protein, is required for methylation of lysine 4 residues on histone H3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11535-40

C

Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, Evans S (2003) *Isl1* identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell* 5: 877-889

Cairns BR (2009) The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters. *Nature* 461: 193-8. Review

Campbell RK, Satoh N, Degnan BM (2004) Piecing together evolution of the vertebrate endocrine system. *Trends Genet* 20: 359-366

Campion CE, Turzillo AM, Clay CM (1996) The gene encoding the ovine gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: cloning and initial characterization. *Gene* 170: 277-280

Cao R, Zhang Y (2004) The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev* 14: 155-64. Review

Caraty A, Duittoz A, Pelletier J, Thiéry JC, Tillet Y, Bouchard P (2001) Libération pulsatile des gonadotropines, de la prolactine et de la GH. Le contrôle de la pulsativité de LH. In : « La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme », C Thibault, MC Levasseur, ed Ellipse, Chap 4: 85-98

Carninci P, Sandelin A, Lenhard B, Katayama S, Shimokawa K, Ponjavic J, Semple CA, Taylor MS, Engström PG, Frith MC et al (2006) Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat Genet* 38(6):626-35. Erratum in: *Nat Genet* 39: 1174.

Catala M et Trouillas J (2006) Embryologie de l'hypophyse humaine (français) EMC Elsevier SAS

Ceccatelli S, Hulting AL, Zhang X, Gustafsson L, Villar M, Hökfelt T (1993) Nitric oxide synthase in the rat anterior pituitary gland and the role of nitric oxide in regulation of luteinizing hormone secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11292-11296

Cedars MI, Lu JK, Meldrum DR, Judd HL (1990) Treatment of endometriosis with a long-acting gonadotropin-releasing hormone agonist plus medroxyprogesterone acetate. *Obstet Gynecol* 75: 641-5

Chauvin S, Berault A, Lerrant Y, Hibert M, Counis R (2000) Functional importance of transmembrane helix 6 Trp(279) and exoloop 3 Val(299) of rat gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol Pharmacol* 57: 625-633

Chehab FF, Mounzih K, Lu R, Lim ME (1997) Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science* 275: 88-90

Cheng C, Sharp PA. (2003) RNA polymerase II accumulation in the promoter-proximal region of the dihydrofolate reductase and gamma-actin genes. *Mol Cell Biol* 23: 1961-7

- Chi L, Zhou W, Prikhovzhan A, Flanagan C, Davidson JS, Golembo M, Illing N, Millar RP, Sealfon SC (1993)** Cloning and characterization of the human GnRH receptor. *Mol Cell Endocrinol* 91: R1-6
- Ciccone DN, Su H, Hevi S, Gay F, Lei H, Bajko J, Xu G, Li E, Chen T (2009)** KDM1B is a histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints. *Nature* 461: 415-8
- Cierpicki T, Risner LE, Grembecka J, Lukasik SM, Popovic R, Omonkowska M, Shultis DD, Zeleznik-Le NJ, Bushweller JH (2010)** Structure of the MLL CXXC domain-DNA complex and its functional role in MLL-AF9 leukemia. *Nat Struct Mol Biol* 17: 62-8
- Cirillo D, Rachiglio AM, la Montagna R, Giordano A, Normanno N (2008)** Leptin signaling in breast cancer: an overview. *J Cell Biochem* 105: 956–964
- Clarke IJ, Cummins JT (1982)** The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 111: 1737-1739
- Clay CM, Nelson SE, Digregorio GB, Campion CE, Wiedemann AL, Nett RJ (1995)** Cell-specific expression of the mouse gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene is conferred by elements residing within 500 bp of proximal 5' flanking region. *Endocrine* 3: 615-622
- Clément K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gormelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougnères P, Lebouc Y, Froguel P, Guy-Grand B (1998)** A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 392: 398–401
- Cobos I, Shimamura K, Rubenstein JL, Martínez S, Puelles L (2001)** Fate map of the avian anterior forebrain at the four-somite stage, based on the analysis of quail-chick chimeras. *Dev Biol* 239: 46-67.
- Conn PM, Janovick JA, Stanislaus D, Kuphal D, Jennes L (1995)** Molecular and cellular bases of gonadotropin-releasing hormone action in the pituitary and central nervous system. *Vitam Horm* 50: 151-214.
- Cook JV, Eidne KA (1997)** An intramolecular disulfide bond between conserved extracellular cysteines in the gonadotropin-releasing hormone receptor is essential for binding and activation. *Endocrinology* 138: 2800–2806
- Core LJ, Waterfall JJ, Lis JT (2008)** Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science* 322: 1845-8
- Cosgrove MS, Patel A (2010)** Mixed lineage leukemia: a structure-function perspective of the MLL1 protein. *FEBS* 277: 1832-42. Review
- Couly GF, Le Douarin NM (1987)** Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. II. The prosencephalic neural plate and neural folds: implications for the genesis of cephalic human congenital abnormalities. *Dev Biol* 120: 198-214.
- Counis R, Garrel G, Laverriere JN, Simon V, Bleux C, Magre S, Cohen-Tannoudji J (2009)** The GnRH receptor and the response of gonadotrope cells to GnRH pulse frequency code. A story of an atypical adaptation of cell function relying on a lack of receptor homologous desensitization. *Folia Histochem Cytobiol* 47: S81-87
- Cuddapah S, Roh TY, Cui K, Jose CC, Fuller MT, Zhao K, Chen X (2012)** A novel human Polycomb binding site acts as a functional Polycomb response element in *Drosophila*. *PLoS One* 7: e36365
- Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA (1999)** Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod* 60: 216–222
- Curtiss J, Heilig, JS (1998)** DeLIMiting development. *Bioessays* 20: 58–69

D

- Dalkin AC, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Ellis TR, Marshall JC (1989)** The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 125: 917-924
- Dasen JS, Rosenfeld MG (1999)** Signaling mechanisms in pituitary morphogenesis and cell fate determination. *Curr Opin Cell Biol* 11: 669-77.
- Dasen JS, Rosenfeld MG (2001)** Signaling and transcriptional mechanisms in pituitary development. *Annu Rev Neuroscience* 24: 327-55.
- Davidson JS, Flanagan CA, Becker II, Illing, N Sealton S.C. Millar, RP. (1994a)** Molecular function of the gonadotropin-releasing hormone receptor: Insights from site-directed mutagenesis. *Mol Cell Endocrinol* 100: 9–14
- Davidson JS, Flanagan CA, Davies PD, Hapgood J, Myburgh D, Elario R, Millar RP, Forrest-Owen W, McArdle CA (1996a)** Incorporation of an additional glycosylation site enhances expression of functional human gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocrine* 4: 207–212
- Davidson JS, Flanagan CA, Zhou W, Becker II, Elario R, Emeran W, Sealton SC, Millar RP (1995)** Identification of N-glycosylation sites in the gonadotropin-releasing hormone receptor: role in receptor expression but not ligand binding. *Mol Cell Endocrinol* 107: 241-245
- Davidson JS, McArdle CA, Davies PD, Elario R, Flanagan CA, Millar RP (1996b)** Asn102 of the gonadotropin-releasing hormone receptor is a critical determinant of potency for agonists containing c-terminal glycineamide. *J Biol Chem* 271: 15510–15514
- Davidson JS, Wakefield IK, Millar RP (1994b)** Absence of rapid desensitization of the mouse gonadotropin-releasing hormone receptor. *Biochem J* 300: 299–302
- Davis AM, Seney ML, Walker HJ, Tobet SA (2004)** Differential colocalization of Islet-1 and estrogen receptor alpha in the murine preoptic area and hypothalamus during development. *Endocrinology* 145: 360-6
- Dawid IB, Toyama R, Taira M (1995)** LIM domain proteins. *C R Acad Sci III* 318: 295–306
- Deaton AM, Bird A (2011)** CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 25: 1010-22. Review
- Dong J, Asa S, Drucker DJ (1991)** Islet cell and extrapancreatic expression of the LIM domain homeobox gene *isl-1*. *Mol Endocrinol* 5: 1633–1641
- Dos Santos S, Bardet C, Bertrand S, Escriva H, Habert D, Queraat B (2009)** Distinct expression patterns of glycoprotein hormone- α 2 and - β 5 in a basal chordate suggest independent developmental functions. *Endocrinology* 150: 3815-3822
- Dou Y, Milne TA, Tackett AJ, Smith ER, Fukuda A, Wysocka J, Allis CD, Chait BT, Hess JL, Roeder RG (2005)** Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF. *Cell* 121: 873-85.
- Duittoz AH, Batailler M, Caldani M (1998)** Primary culture of GnRH neurons derived from the sheep embryo olfactory placode. *Ann N Y Acad Sci* 839: 358-60.
- Duval DL, Nelson SE, Clay CM (1997b)** The tripartite basal enhancer of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene promoter regulates cell-specific expression through a novel GnRH receptor activating sequence. *Mol Endocrinol* 11: 1814-21

E

- Eidne KA, Flanagan CA, Millar RP (1985)** Gonadotropin-releasing hormone binding sites in human breast carcinoma. *Science* 229: 989-991
- El Meskini R, Mains RE, Eipper BA (2000)** Cell type-specific metabolism of peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase in anterior pituitary. *Endocrinology* 141: 3020-34.
- Elshatory Y, Everhart D, Deng M, Xie X, Barlow RB, Gan L (2007)** Islet-1 controls the differentiation of retinal bipolar and cholinergic amacrine cells. *J Neurosci* 27: 12707-20.
- Elshatory Y, Gan L (2008)** The LIM-homeobox gene Islet-1 is required for the development of restricted forebrain cholinergic neurons. *J Neurosci* 28: 3291-7.
- Emmelot-Vonk MH, Verhaar HJ, Nakhai Pour HR, Aleman A, Lock TM, Bosch JL, Grobbee DE, van der Schouw YT (2008)** Effect of testosterone supplementation on functional mobility, cognition, and other parameters in older men: a randomized controlled trial. *JAMA* 299: 39-52.
- Emons G, Pahwa GS, Brack C, Sturm R, Oberheuser F, Knuppen R (1989)** Gonadotropin releasing hormone binding sites in human epithelial ovarian carcinomata. *Eur J Cancer Clin Oncol* 25: 215-221
- Emons G, Schally AV (1994)** The use of luteinizing hormone releasing hormone agonists and antagonists in gynaecological cancers. *Hum Reprod* 9: 1364-1379
- Ericson J, Norlin S, Jessell TM, Edlund T (1998)** Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development* 125: 1005-1015
- Ericson J, Thor S., Edlund T, Jessell TM, Yamada T (1992).** Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene Islet-1. *Science* 256: 1555-1560
- Esteller M (2002)** CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21: 5427-40. Review
- Esteller M (2007)** Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet* 16: R50-9. Review
- Esteller M (2008)** Epigenetics in evolution and disease. *Lancet* 372: S90-S96 Review

F

- Fan NC, Jeung EB, Peng C, Olofsson JL, Krisinger J, Leung PC (1994)** The human gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene: cloning, genomic organization and chromosomal assignment. *Mol Cell Endocrinol* 103: R1-6
- Fauquier T, Guérineau NC, McKinney RA, Bauer K, Mollard P (2001)** Folliculostellate cell network: a route for long-distance communication in the anterior pituitary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8891-8896
- Finch AR, Caunt CJ, Armstrong SP, McArdle CA (2009)** Agonist-induced internalization and downregulation of gonadotropin-releasing hormone receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 297: C591-600
- Fink MY, Pincas H, Choi SG, Nudelman G, Sealfon SC (2010)** Research resource: Gonadotropin-releasing hormone receptor-mediated signaling network in LbetaT2 cells: a pathway-based web-accessible knowledgebase. *Mol Endocrinol* 24: 1863-71
- Flanagan CA, Becker II, Davidson JS, Wakefield IK, Zhou W, Sealfon SC, Millar RP (1994)** Glutamate 301 of the mouse gonadotropin-releasing hormone receptor confers specificity for arginine 8 of mammalian gonadotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* 269: 22636-22641

Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C et al (2005) Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 37: 391-400

Franklin TB, Mansuy IM (2010) The prevalence of epigenetic mechanisms in the regulation of cognitive functions and behavior. *Curr Opin Neurobiol* 20: 441-9

Fortier C (1952) Humoral and nervous control of adrenocorticotrophic function. *Union Med Can* 81: 1406-27.

Frühbeck G (2006) Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* 393: 7-20

Fukata J, Usui T, Naitoh Y, Nakai Y, Imura H (1989) Effects of recombinant human interleukin-1 alpha, -1 beta, 2 and 6 on ACTH synthesis and release in the mouse pituitary tumour cell line AtT-20. *J Endocrinol* 122: 33-9.

Fukuda S, Taga T (2005) Cell fate determination regulated by a transcriptional signal network in the developing mouse brain. *Anat Sci Int* 80: 12-8. Review

Furth J, Gadsen EI, Upton AC (1953) ACTH secreting transplantable pituitary tumors. *Proc Soc Exp Biol Med* 84: 253-4

G

Gadd MS, Bhati M, Jeffries CM, Langley DB, Trehella J, Guss JM, Matthews JM (2011) Structural basis for partial redundancy in a class of transcription factors, the LIM homeodomain proteins, in neural cell type specification. *J Biol Chem* 286: 42971-80

Galli-Resta L, Resta G, Tan SS, Reese BE (1997) Mosaics of islet-1-expressing amacrine cells assembled by short-range cellular interactions. *J Neurosci* 17: 7831-8

García-Carpizo V, Ruiz-Llorente L, Fraga M, Aranda A (2011) The growing role of gene methylation on endocrine function. *J Mol Endocrinol* 47: R75-89

Gardiner-Garden M, Frommer M (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196: 261-82.

Garrel G, Delahaye R, Hemmings BA, Counis R (1995) Modulation of regulatory and catalytic subunit levels of cAMP-dependent protein kinase A in anterior pituitary cells in response to direct activation of protein kinases A and C or after GnRH stimulation. *Neuroendocrinology* 62: 514-522

Garrel G, Lerrant Y, Siriositis C, Bérault A, Magre S, Bouchaud C, Counis R (1998) Evidence that gonadotropin-releasing hormone stimulates gene expression and levels of active nitric oxide synthase type I in pituitary gonadotrophs, a process altered by desensitization and, indirectly, by gonadal steroids. *Endocrinology* 139: 2163-2170

Gay F, Anglade I, Gong Z, Salbert G (2000). The LIM/homeodomain protein islet-1 modulates estrogen receptor functions. *Mol Endocrinol* 14: 1627-1648.

Gleiberman AS, Michurina T, Encinas JM, Roig JL, Krasnov P, Balordi F, Fishell G, Rosenfeld MG, Enikolopov G (2008) Genetic approaches identify adult pituitary stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 6332-7. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 11032

Goll MG, Bestor TH (2005) Eukaryotic cytosine méthyletransférases. *Annu Rev Biochem* 74: 481-514.

Gorivodsky M, Mukhopadhyay M, Wilsch-Braeuninger M, Phillips M, Teufel A, Kim C, Malik N, Huttner W, Westphal H (2009) Intraflagellar transport protein 172 is essential for primary cilia formation and plays a vital role in patterning the mammalian brain. *Dev Biol* 325: 24-32.

Goto MP, Goldman AS (1994) Diabetic embryopathy. *Curr Opin Pediatr* 6: 486-91.

Gourdji D, Laverriere JN, Passequé E, Richard JL (1992) Hypophyseal cells model systems: the "GH" rat tumor-derived cell lines as a tool for the study of gene expression. *Cell Biol Toxicol* 8: 29-38.

Granger A, Bleux C, Kottler ML, Rhodes SJ, Counis R, Laverriere JN (2006) The LIM-homeodomain proteins Isl-1 and Lhx3 act with steroidogenic factor 1 to enhance gonadotrope-specific activity of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene promoter. *Mol Endocrinol* 20: 2093-2108

Granger A, Ngo-Muller V, Bleux C, Guigon C, Pincas H, Magre S, Daegelen D, Tixier-Vidal A, Counis R, Laverriere JN (2004) The promoter of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor gene directs the expression of the human placental alkaline phosphatase reporter gene in gonadotrope cells in the anterior pituitary gland as well as in multiple extrapituitary tissues. *Endocrinology* 145: 983-993

Grosse R, Roelle S, Herrlich A, Höhn J, Gudermann T (2000b) Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase mediates Ras activation by gonadotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* 275: 12251-12260

Grosse R, Schmid A, Schöneberg T, Herrlich A, Muhn P, Schultz G, Gudermann T (2000a) Gonadotropin-releasing hormone receptor initiates multiple signaling pathways by exclusively coupling to G(q/11) proteins. *J Biol Chem* 275: 9193-9200

Guillemin R et Hearn WR (1955) ACTH release by *in vitro* pituitary; effect of pitressin and purified arginine-vasopressin. *Proc Soc Exp Biol Med* 89: 365-7.

Gumbiner B, Kelly RB (1981) Secretory granules of an anterior pituitary cell line, AtT-20, contain only mature forms of corticotropin and beta-lipotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78: 318-22.

H

Haisenleder DJ, Cox ME, Parsons SJ, Marshall JC (1998) Gonadotropin-releasing hormone pulses are required to maintain activation of mitogen-activated protein kinase: role in stimulation of gonadotrope gene expression. *Endocrinology* 139: 3104-11.

Hapgood JP, Sadie H, van Biljon W, Ronacher K (2005) Regulation of expression of mammalian gonadotrophin-releasing hormone receptor genes. *J Neuroendocrinol* 17: 619-638

Harris D, Reiss N, Naor Z (1997) Differential activation of protein kinase C δ and ϵ gene expression by gonadotropin-releasing hormone in α T3-1 cells. Autoregulation by protein kinase C. *J Biol Chem* 272: 13534-13540

Harris GW, Jacobsohn D (1952) Functional grafts of the anterior pituitary gland. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 139: 263-276

Hashimoto H, Vertino PM, Cheng X (2010) Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. *Epigenomics* 2: 657-69. Review

Hassan AH, Prochasson P, Neely KE, Galasinski SC, Chandy M, Carrozza MJ, Workman JL (2002) Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* 111: 369-79

Hawes BE, Barnes S, Conn PM (1993) Cholera toxin and pertussis toxin provoke differential effects on luteinizing hormone release, inositol phosphate production, and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor binding in the gonadotrope: evidence for multiple guanyl nucleotide binding proteins in GnRH action. *Endocrinology* 132: 2124-2130

Hazum E, Cuatrecasas P, Marian J, Conn PM (1980) Receptor-mediated internalization of fluorescent gonadotropin-releasing hormone by pituitary gonadotropes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 6692-5.

Hazum E (1987) Binding properties of solubilized gonadotropin-releasing hormone receptor: role of carboxylic groups. *Biochemistry* 26: 7011-4

Herbison AE, Pape JR (2001) New evidence for estrogen receptors in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Front Neuroendocrinol* 22: 292-308

Herrid M, Xia Y, O'Shea T, McFarlane JR (2008) Leptin inhibits basal but not gonadotrophin-stimulated testosterone production in the immature mouse and sheep testis. *Reprod Fertil Dev* 20: 519-528

Ho L, Crabtree GR (2010) Chromatin remodelling during development. *Nature* 463: 474-84. Review

Horbelt D, Denkis A, Knaus P (2012) A portrait of Transforming Growth Factor β superfamily signalling: Background matters. *Int J Biochem Cell Biol* 44: 469-74 Review

Horswill MA, Narayan M, Warejcka DJ, Cirillo LA, Twining SS (2008) Epigenetic silencing of maspin expression occurs early in the conversion of keratocytes to fibroblasts. *Exp Eye Res* 86: 586-600

Hsieh KP, Martin TF (1992) Thyrotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate-binding proteins Gq and G11. *Mol Endocrinol* 6: 1673-1681

Hunter CS, Rhodes SJ (2005) LIM-homeodomain genes in mammalian development and human disease. *Mol Biol Rep* 32: 67-77

I

Illing N, Troskie BE, Nahorniak CS, Hapgood JP, Peter RE, Millar RP (1999) Two gonadotropin-releasing hormone receptor subtypes with distinct ligand selectivity and differential distribution in brain and pituitary in the goldfish (*Carassius auratus*). *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2256-2531

Illingworth RS, Gruenewald-Schneider U, Webb S, Kerr AR, James KD, Turner DJ, Smith C, Harrison DJ, Andrews R, Bird AP (2010) Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet* 6: e1001134.

Imai A, Takagi H, Horibe S, Fuseya T, Tamaya T (1996) Coupling of gonadotropin-releasing hormone receptor to Gi protein in human reproductive tract tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3249-3253

Ingraham HA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Shen WH, Nachtigal MW, Abbud R, Nilson JH, Parker KL (1994) The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev* 8: 2302-2312

Inoue A, Takahashi M, Hatta K, Hotta Y, Okamoto H (1994) Developmental regulation of islet-1 mRNA expression during neuronal differentiation in embryonic zebrafish. *Dev Dyn* 199: 1-11.

Inoue K, Mogi C, Ogawa S, Tomida M, Miyai S (2002) Are folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland supportive cells or organ-specific stem cells? *Arch Physiol Biochem* 110: 50-53

Iqbal J, Pompolo S, Considine RV, Clarke IJ (2000) Localization of leptin receptor-like immunoreactivity in the corticotropes, somatotropes, and gonadotropes in the ovine anterior pituitary. *Endocrinology* 141: 1515-1520

Ishii H, Sato S, Yin C, Sakuma Y, Kato M (2009) Cetrorelix, a gonadotropin-releasing hormone antagonist, induces the expression of melatonin receptor 1a in the gonadotropin-releasing hormone neuronal cell line GT1-7. *Neuroendocrinology* 90: 251-9

J

Jackson JP, Lindroth AM, Cao X, Jacobsen SE (2002) Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase *Nature* 416: 556-60

Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* 293: 1074-80. Review

Jeong KH, Chin WW, Kaiser UB (2004) Essential role of the homeodomain for pituitary homeobox 1 activation of mouse gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression through interactions with c-Jun and DNA. *Mol Cell Biol* 24: 6127-6139

Jin L, Zhang S, Burguera BG, Couce ME, Osamura RY, Kulig E, Lloyd RV (2000) Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology* 141: 333-339

Juliandi B, Abematsu M, Nakashima K (2010) Epigenetic regulation in neural stem cell differentiation. *Dev Growth Differ* 52: 493-504. Review

Juven-Gershon T, Hsu JY, Theisen JW, Kadonaga JT (2008) The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription. *Curr Opin Cell Biol* 20: 253-9

K

Kaiser UB, Dushkin H, Altherr MR, Beier DR, Chin WW (1994) Chromosomal localization of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene to human chromosome 4q13 1-q211 and mouse chromosome 5. *Genomics* 20: 506-508

Kakar SS (1997) Molecular structure of the human gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Eur J Endocrinol* 137: 183-192

Kakar SS, Grantham K, Musgrove LC, Devor D, Sellers JC, Neill JD (1994a) Rat gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: tissue expression and hormonal regulation of its mRNA. *Mol Cell Endocrinol* 101: 151-157

Kakar SS, Malik MT, Winters SJ, Mazhawidza W (2004) Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure, expression, and signaling transduction. *Vitam Horm* 69: 151-207.

Kakar SS, Musgrove LC, Devor DC, Sellers JC, Neill JD (1992) Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 289-295

Kakar SS, Winters SJ, Zacharias W, Miller DM, Flynn S (2003) Identification of distinct gene expression profiles associated with treatment of LbetaT2 cells with gonadotropin-releasing hormone agonist using microarray analysis. *Gene* 308: 67-77

Kang J, Nathan E, Xu SM, Tzahor E, Black BL (2009) *Isl1* is a direct transcriptional target of Forkhead transcription factors in second-heart-field-derived mesoderm. *Dev Biol* 334: 513-22

Kappen C, Salbaum JM (2009) Identification of regulatory elements in the *Isl1* gene locus. *Int J Dev Biol* 53: 935-46.

Karlsson O, Thor S, Norberg T, Ohlsson H, Edlund T (1990) Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature* 344: 879-882

Karten MJ et Rivier JE (1986) Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-function studies toward the development of agonists and antagonists: Rationale and perspective. *Endocr Rev* 7: 44-66

Kim TH, Barrera LO, Zheng M, Qu C, Singer MA, Richmond TA, Wu Y, Green RD, Ren B (2005) A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* 436: 876-80.

Kim JK, Samaranayake M, Pradhan S (2009) Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci* 66: 596-612. Review

King JA, Millar RP (1992) Evolution of gonadotropin-releasing hormone. *Trends Endocrinol Metab* 3: 339-346

Kioussi C, O'Connell S, St-Onge L, Treier M, Gleiberman AS, Gruss P, Rosenfeld MG (1999) Pax6 is essential for establishing ventral-dorsal cell boundaries in pituitary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14378-82.

Klinge CM, Jernigan SC, Smith SL, Tyulmenkov VV, Kulakosky PC. (2001) Estrogen response element sequence impacts the conformation and transcriptional activity of estrogen receptor alpha. *Mol Cell Endocrinol* 174: 151-66.

Klose RJ, Bird AP (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 31: 89-97. Review

Knobil E (1990) The GnRH pulse generator. *Am J Obstet Gynecol* 163: 1721-1727

Korzh V, Edlund T, Thor S (1993) Zebrafish primary neurons initiate expression of the LIM homeodomain protein Isl-1 at the end of gastrulation. *Development* 118: 417-25

Kouki T, Imai H, Aoto K, Eto K, Shioda S, Kawamura K, Kikuyama S (2001) Developmental origin of the rat adenohypophysis prior to the formation of Rathke's pouch. *Development* 128: 959-63.

Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function *Cell* Feb 23; 128: 693-705 Review

Krsmanovic LZ, Stojilkovic SS, Mertz LM, Tomic M, Catt KJ (1993) Expression of gonadotropin-releasing hormone receptors and autocrine regulation of neuropeptide release in immortalized hypothalamic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3908-3912

Krsmanovic LZ, Martinez-Fuentes AJ, Arora KK, Mores N, Navarro CE, Chen HC, Stojilkovic SS, Catt KJ (1999) Autocrine regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion in cultured hypothalamic neurons. *Endocrinology* 140: 1423-31

Ku M, Koche RP, Rheinbay E, Mendenhall EM, Endoh M, Mikkelsen TS, Presser A, Nusbaum C, Xie X, Chi AS, Adli M, Kasif S, Ptaszek LM, Cowan CA, Lander ES, Koseki H, Bernstein BE (2008) Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet* 4: e1000242

Kumbrink J, Kirsch KH, Johnson JP (2010) EGR1, EGR2, and EGR3 activate the expression of their coregulator NAB2 establishing a negative feedback loop in cells of neuroectodermal and epithelial origin. *J Cell Biochem* 111: 207-17.

L

Lahlou N, Carel JC, Chaussain JL, Roger M (2000) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of GnRH agonists: clinical implications in pediatrics. *J Pediatr Endocrinol Metab Suppl* 1: 723-737

Lahlou N, Roger M, Chaussain JL, Feinstein MC, Sultan C, Toubiane JE, Schally AV, Scholler R (1987) Gonadotropin and alpha-subunit secretion during long term pituitary suppression by D-Trp6-luteinizing hormone-releasing hormone microcapsules as treatment of precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 65: 946-953

Lalloz MR, Datta A, Clayton RN (1988) Gonadotropin-releasing hormone desensitization preferentially inhibits expression of the luteinizing hormone β -subunit gene *in vivo*. *Endocrinology* 122: 1689-1694

Landolin JM, Johnson DS, Trinklein ND, Aldred SF, Medina C, Shulha H, Weng Z, Myers RM (2010) Sequence features that drive human promoter function and tissue specificity. *Genome Res* 20: 890-8

Lariviere S, Garrel G, Simon V, Soh JW, Laverriere JN, Counis R, Cohen-Tannoudji J (2007) Gonadotropin-releasing hormone couples to 3',5'-cyclic adenosine-5'-monophosphate pathway through novel protein kinase Cdelta and -epsilon in LbetaT2 gonadotrope cells. *Endocrinology* 148: 1099-1107

- Larivière S, Garrel-Lazayres G, Simon V, Shintani N, Baba A, Counis R, Cohen-Tannoudji J (2008)** Gonadotropin-releasing hormone inhibits pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide coupling to 3',5'-cyclic adenosine-5'-monophosphate pathway in LbetaT2 gonadotrope cells through novel protein kinase C isoforms and phosphorylation of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide type I receptor. *Endocrinology* 149: 6389-98
- Laurent L, Wong E, Li G, Huynh T, Tsirigos A, Ong CT, Low HM, Kin Sung KW, Rigoutsos I, Loring J, Wei CL (2010)** Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res* 20: 320-31
- Laursen KB, Wong PM, Gudas LJ (2011)** Epigenetic regulation by RAR α maintains ligand-independent transcriptional activity. *Nucleic Acids Res* 40: 102-15
- Laverrière JN, Muller M, Buisson N, Tougard C, Tixier-Vidal A, Martial JA, Gourdji D (1986)** Differential implication of deoxyribonucleic acid methylation in rat prolactin and rat growth hormone gene expressions: a comparison between rat pituitary cell strains. *Endocrinology* 118: 198-206.
- Lee SK, Pfaff SL (2003)** Synchronization of neurogenesis and motor neuron specification by direct coupling of bHLH and homeodomain transcription factors. *Neuron* 38: 731-745
- Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS et al (2006)** Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 125: 301-13
- Lefkowitz RJ (1998)** G protein-coupled receptors III New roles for receptor kinases and β -arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem* 273: 186673-18680
- Leonard J, Serup P, Gonzalez G, Edlund T, Montminy M (1992)** The LIM family transcription factor Isl-1 requires cAMP response element binding protein to promote somatostatin expression in pancreatic islet cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6247-6251.
- Lerrant Y, Kottler ML, Bergametti F, Moumni M, Blumberg-Tick J, Counis R (1995)** Expression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene is altered by GnRH agonist desensitization in a manner similar to that of gonadotropin betasubunit genes in normal and castrated rat pituitary. *Endocrinology* 136: 2803-2808
- Levi NL, Hanoch T, Benard O, Rozenblat M, Harris D, Reiss N, Naor Z, Seger R (1998)** Stimulation of Jun N-terminal kinase (JNK) by gonadotropin-releasing hormone in pituitary alpha T3-1 cell line is mediated by protein kinase C, c-Src, and CDC42 *Mol. Endocrinol* 12: 815-824
- Li B, Carey M, Workman JL (2007)** The role of chromatin during transcription. *Cell* 2007 128: 707-19. Review
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1992)** Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69: 915-26
- Li H, Robinson PJ, Kawashima S, Funder JW, Liu JP (1998)** Differential regulation of MAP kinase activity by corticotropin-releasing hormone in normal and neoplastic corticotropes. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 1389-401.
- Lienert F, Wirbelauer C, Som I, Dean A, Mohn F, Schübeler D (2011)** Identification of genetic elements that autonomously determine DNA methylation states. *Nat Genet* 43: 1091-7
- Limonta P, Moretti RM, Marelli MM, Dondi D, Parenti M, Motta M (1999)** The luteinizing hormone-releasing hormone receptor in human prostate cancer cells: messenger ribonucleic acid expression, molecular size, and signal transduction pathway. *Endocrinology* 140: 5250-5256
- Lin L, Cui L, Zhou W, Dufort D, Zhang X, Cai CL, Bu L, Yang L, Martin J, Kemler R, Rosenfeld MG, Chen J, Evans SM (2007)** Beta-catenin directly regulates Islet1 expression in cardiovascular progenitors and is required for multiple aspects of cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 9313-8
- Liu F, Usui I, Evans LG, Austin DA, Mellon PL, Olefsky JM, Webster NJ (2002)** Involvement of both G(q/11) and G(s) proteins in gonadotropin-releasing hormone receptor-mediated signaling in L beta T2 cells. *J Biol Chem* 277: 32099-32108
- Liu J, He Y, Wang X, Zheng X, Cui S (2005b)** Developmental changes of Islet-1 and its co-localization with pituitary hormones in the pituitary gland of chick embryo by immunohistochemistry. *Cell Tissue Res* 322: 279-287

Liu J, Liu Z, Yi S, Cui S (2005a) Islet-1 expression and its colocalization with luteinising hormone, thyroid-stimulating hormone and oestrogen receptor α in the developing pituitary gland of the sheep foetus. *J Neuroendocrinol* 17: 773–780

Liu CL, Kaplan T, Kim M, Buratowski S, Schreiber SL, Friedman N, Rando OJ (2005) Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*. *PLoS Biol* 3: e328.

Liu Y, Li Y, Li T, Lu H, Jia Z, Wang W, Chen P, Ma K, Zhou C (2010) POU homeodomain protein OCT1 modulates islet 1 expression during cardiac differentiation of P19CL6 cells. *Cell Mol Life Sci* 68: 1969–82.

Llomas B, Holland ML, Chen K, Cropley JE, Cooper A, Suter CM (2012) High-resolution analysis of cytosine methylation in ancient DNA. *PLoS One* 7: e30226

Lovejoy DA (2006) Elaboration of Neuroendocrine Systems In: « Neuroendocrinology: An Integrated Approach ». Ed John Wiley & Sons 4: 85–117

Lozach A, Garrel G, Lerrant Y, Bérault A, Counis R (1998) GnRH-dependent up-regulation of nitric oxide synthase I level in pituitary gonadotrophs mediates cGMP elevation during rat proestrus. *Mol Cell Endocrinol* 143: 43–51

Lumsden A (1995) Neural development. A 'LIM code' for motor neurons? *Curr Biol* 5: 491–5. Review

Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251–60

M

Ma Q, Zhou B, Pu WT (2008) Reassessment of *Isl1* and *Nkx2-5* cardiac fate maps using a Gata4-based reporter of Cre activity. *Dev Biol* 323: 98–104

Margueron R, Reinberg D (2011) The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469: 343–9. Review

Martin B, Golden E, Carlson OD, Egan JM, Mattson MP, Maudsley S (2008) Caloric restriction: impact upon pituitary function and reproduction. *Ageing Res Rev* 7: 209–224

Matsumoto AM, Bremner WJ (1984) Modulation of pulsatile gonadotropin secretion by testosterone in man. *J Clin Endocrinol Metab* 58: 609–614

Matsuo H, Baba Y, Nair RM, Arimura A, Schally AV (1971) Structure of the porcine LH-and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 43: 1334–1339

Matteri RL, Roser JF, Baldwin DM, Lipovetsky V, Papkoff H (1987) *Domest Anim Endocrinol* 4: 157–165

Matthews JM, Bhati M, Craig VJ, Deane JE, Jeffries C, Lee C, Nancarrow AL, Ryan DP, Sunde M (2008) Competition between LIM-binding domains. *Biochem Soc Trans Dec*; 36: 1393–7.

McArdle CA, Willars GB, Fowkes RC, Nahorski SR, Davidson JS, Forrest-Owen W (1996) Desensitization of gonadotropin-releasing hormone action in alphaT3-1 cells due to uncoupling of inositol 1,4,5 trisphosphate generation and Ca²⁺ mobilization. *J Biol Chem* 271: 23711–23717

McArdle CA, Davidson JS, Willars GB (1999) The tail of the gonadotrophin-releasing hormone receptor: desensitization at, and distal to, G protein-coupled receptors. *Mol Cell Endocrinol* 151: 129–136

McGillivray SM, Bailey JS, Ramezani R, Kirkwood BJ, Mellon PL (2005) Mouse GnRH receptor gene expression is mediated by the LHX3 homeodomain protein. *Endocrinology* 146: 2180–2185

Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL, Weiner RI (1990) immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* 5: 1-10

Melmed S (1982) GH3 rat pituitary tumor cells are deficient in hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 108: 1460-6.

Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A et al (2007) Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448: 553-60.

Millar RP, Lu ZL, Pawson AJ, Flanagan CA, Morgan K, Maudsley SR (2004) Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev* 25: 235-275

Miller WL, Huang ES (1985) Secretion of ovine luteinizing hormone *in vitro*: differential positive control by 17 betaestradiol and a preparation of porcine ovarian inhibin. *Endocrinology* 117: 907-911

Mitsiadis TA, Angeli I, James C, Lendahl U, Sharpe PT (2003) Role of *Islet1* in the patterning of murine dentition. *Development* 130: 4451-60

Moretti A, Caron L, Nakano A, Lam JT, Bernshausen A, Chen Y, Qyang Y, Bu L, Sasaki M, Martin-Puig S, Sun Y, Evans SM, Laugwitz KL, Chien KR (2006) Multipotent embryonic *isl1*+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell* 127: 1151-65.

Moumni M, Kottler ML, Counis R (1994) Nucleotide sequence analysis of mRNAs predicts that rat pituitary and gonadal gonadotropin-releasing hormone receptor proteins have identical primary structure. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 1359-1366

Müller M, Jabs N, Lorke DE, Fritzsche B, Sander M (2003) *Nkx6.1* controls migration and axon pathfinding of cranial branchio-motoneurons. *Development* 130: 5815-26.

N

Naor Z (2009) Signaling by G-protein-coupled receptor (GPCR): studies on the GnRH receptor. *Front Neuroendocrinol* 30: 10-29

Naor Z, Benard O, Seger R (2000) Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab* 11: 91-99

Nathan E, Monovich A, Tirosh-Finkel L, Harrelson Z, Rousso T, Rinon A, Harel I, Evans SM, Tzahor E (2008) The contribution of *Islet1*-expressing splanchnic mesoderm cells to distinct branchiomic muscles reveals significant heterogeneity in head muscle development. *Development* 135: 647-57.

Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108: 475-87. Review

Nozaki M, Ominato K, Takahashi A, Kawauchi H, Sower SA (2001) Adenohypophysial cell types in the lamprey pituitary: current state of the art. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 129: 303-9.

O

Ogasawara H, Ohwada S, Nagai Y, Taketa Y, Matsuzaki M, Tanaka S, Watanabe K, Aso H, Yamaguchi T (2008) Localization of leptin and leptin receptor in the bovine adenohypophysis. *Domest Anim Endocrinol* 35: 8-15

Ojeda SR, Lomniczi A, Sandau US (2008) Glial-gonadotrophin hormone (GnRH) neurone interactions in the median eminence and the control of GnRH secretion. *J Neuroendocrinol* 20: 732-742

Okado N, Yokota N (1980) An electron microscopic study on the structural development of the neural lobe in the human fetus. *Am J Anat* 159: 261-73

Ooi GT, Tawadros N, Escalona RM (2004) Pituitary cell lines and their endocrine applications. *Mol Cell Endocrinol* 228: 1-21.

Ooi SK, Qiu C, Bernstein E, Li K, Jia D, Yang Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Lin SP, Allis CD, Cheng X, Bestor TH (2007) DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature* 448: 714-7

Ostendorff HP, Tursun B, Cornils K, Schlüter A, Drung A, Güngör C, Bach I (2006) Dynamic expression of LIM cofactors in the developing mouse neural tube. *Dev Dyn* 235: 786-91.

Otsuka F, Shimasaki S (2002) A novel function of bone morphogenetic protein-15 in the pituitary: selective synthesis and secretion of FSH by gonadotropes. *Endocrinology* 143: 4938-41.

P

Pan L, Deng M, Xie X, Gan L (2008) ISL1 and BRN3B co-regulate the differentiation of murine retinal ganglion cells. *Development* 135: 1981-90.

Pan Q, Wu Y, Lin T, Yao H, Yang Z, Gao G, Song E, Shen H (2009) Bone morphogenetic protein-2 induces chromatin remodeling and modification at the proximal promoter of Sox9 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 379: 356-61.

Pawson AJ, Faccenda E, Maudsley S, Lu ZL, Naor Z, Millar RP (2008) Mammalian type I gonadotropin-releasing hormone receptors undergo slow, constitutive, agonist-independent internalization. *Endocrinology* 149: 1415-1422

Pawson AJ, Katz A, Sun YM, Lopes J, Illing N, Millar RP, Davidson JS (1998) Contrasting internalization kinetics of human and chicken gonadotropin-releasing hormone receptors mediated by C-terminal tail. *J Endocrinol* 156: R9-12

Pernasetti F, Vasilyev VV, Rosenberg SB, Bailey JS, Huang HJ, Miller WL, Mellon PL (2001) Cell-specific transcriptional regulation of follicle-stimulating hormone-beta by activin and gonadotropin-releasing hormone in the LbetaT2 pituitary gonadotrope cell model. *Endocrinology* 142: 2284-2295

Perrin MH, Bilezikjian LM, Hoeger C, Donaldson CJ, Rivier J, Haas Y, Vale WW (1993) Molecular and functional characterization of GnRH receptors cloned from rat pituitary and a mouse pituitary tumor cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 191: 1139-1144

Pfaff SL, Mendelsohn M, Stewart CL, Edlund T, Jessell TM (1996) Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* 84: 309-320

Pincas H, Amoyel K, Counis R, Laverriere JN (2001a) Proximal cis-acting elements, including steroidogenic factor 1, mediate the efficiency of a distal enhancer in the promoter of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Mol Endocrinol* 15: 319-337

Pincas H, Forrai Z, Chauvin S, Laverriere JN, Counis R (1998) multiple elements in the distal part of the 1.2 kb 5'-flanking region of the rat GnRH receptor gene regulate gonadotrope-specific expression conferred by proximal domain. *Mol Cell Endocrinol* 144: 95-108

Pincas H, Laverriere JN, Counis R (2001b) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate stimulate the promoter activity of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor gene via a bipartite response element in gonadotrope-derived cells. *J Biol Chem* 276: 23562-23571

Pineda R, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M (2010) Physiological roles of the kisspeptin/GPR54 system in the neuroendocrine control of reproduction. *Prog Brain Res* 181: 55-77

Pitteloud N, Hayes FJ, Dwyer A, Boepple PA, Lee H, Crowley WF Jr (2002) Predictors of outcome of long-term GnRH therapy in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 4128-4136

Poletti A, Rampoldi A, Piccioni F, Volpi S, Simeoni S, Zanisi M, Martini L (2001) 5Alpha-reductase type 2 and androgen receptor expression in gonadotropin releasing hormone GT1-1 cells. *J Neuroendocrinol* 13: 353-357

Pirrotta V, Li HB (2012) A view of nuclear Polycomb bodies. *Curr Opin Genet Dev* 22: 101-9.

Portela A, Esteller M (2010) Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 28: 1057-68. Review

Porter FD, , Drago J, Xu Y, Cheema SS, Wassif C, Huang SP, Lee E, Grinberg A, Massalas JS, Bodine D, Alt F & Westphal H (1997). *Development* 124: 2935–2944

Prevot V, Croix D, Bouret S, Dutoit S, Tramu G, Stefano GB, Beauvillain JC (1999) Definitive evidence for the existence of morphological plasticity in the external zone of the median eminence during the rat estrous cycle: implication of neuro-glioendothelial interactions in gonadotropin-releasing hormone release. *Neuroscience* 94: 809-819

Q

Qayum A, Gullick W, Clayton RC, Sikora K, Waxman J (1990) The effects of gonadotrophin releasing hormone analogues in prostate cancer are mediated through specific tumour receptors. *Br J Cancer* 62: 96–99

R

Ray-Gallet D, Gérard A, Polo S, Almouzni G (2005) [Variations on the topic of the "histone code"]. *Med Sci (Paris)* 21: 384-9. Review

Reinhart J, Mertz LM, Catt KJ (1992) Molecular cloning and expression of cDNA encoding the murine gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem* 267: 21281-21284

Reinhart J, Xiao S, Arora KK, Catt KJ (1997) Structural organization and characterization of the promoter region of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Mol Cell Endocrinol* 130: 1-12

Rice JC, Allis CD (2001) Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol* 13: 263-73. Review

Rincón-Limas DE, Lu CH, Canal I, Calleja M, Rodriguez-Esteban C, Izpisua-Belmonte JC, Botas J (1999) Conservation of the expression and function of apterous orthologs in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2165-2170

Roberson MS, Zhang T, Li HL, Mulvaney JM (1999) Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 140: 1310–1318

Rodet F, Lelong C, Dubos MP, Costil K, Favrel P (2005) Molecular cloning of a molluscan gonadotropin-releasing hormone receptor orthologue specifically expressed in the gonad. *Biochim Biophys Acta* 1730: 187-95

Rodin DA, Lalloz MRA, Clayton RN (1988) Gonadotropin-releasing hormone regulates follicle-stimulating hormone β -subunit gene expression in the male rat. *Endocrinology* 125: 1282-1289

Roelle S, Grosse R, Aigner A, Krell HW, Czubayko F, Gudermann T (2003) Matrix metalloproteinases 2 and 9 mediate epidermal growth factor receptor transactivation by gonadotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* 278: 47307-47318

Roh TY, Cuddapah S, Zhao K (2005) Active chromatin domains are defined by acetylation islands revealed by genome-wide mapping. *Genes Dev* 19: 542-52.

Roh TY, Cuddapah S, Cui K, Zhao K (2006) The genomic landscape of histone modifications in human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 15782-7.

Roy D, Angelini NL, Belsham DD (1999) Estrogen directly respresses gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression in estrogen receptor- α (ER α)-and ER β -expressing GT1-7 GnRH neurons. *Endocrinology* 140: 5045-5053

S

Saffran M, Schally AV (1955) The release of corticotrophin by anterior pituitary tissue *in vitro*. *Can J Biochem Physiol* 33: 408-415

Sánchez-García I, Rabbitts TH (1994) The LIM domain: a new structural motif found in zinc-finger-like proteins. *Trends Genet* 10: 315-20.

Sayers G, Sayers Ma (1947) Regulation of pituitary adrenocorticotrophic activity during the response of the rat to acute stress. *Endocrinology* 40: 265-73.

Schang AL, Bleux C, Chenut MC, Ngô-Muller V, Quérat B, Jeanny JC, Counis R, Cohen-Tannoudji J, Laverrière JN (2012) Identification and Analysis of Two Novel Sites of Rat GnRH Receptor Gene Promoter Activity: The Pineal Gland and Retina. *Neuroendocrinology* Mar 12 Aug 25

Schang AL, Counis R, Magre S, Bleux C, Granger A, Ngô-Muller V, Chenut MC, Ishaq M, Cohen-Tannoudji J, Laverrière JN (2011b) Reporter transgenic mouse models highlight the dual endocrine and neural facet of GnRH receptor function. *Ann N Y Acad Sci* 1220: 16-22.

Schang AL, Ngô-Muller V, Bleux C, Granger A, Chenut MC, Loudes C, Magre S, Counis R, Cohen-Tannoudji J, Laverrière JN (2011a) GnRH receptor gene expression in the developing rat hippocampus: transcriptional regulation and potential roles in neuronal plasticity. *Endocrinology* 152: 568-80.

Schlesinger Y, Straussman R, Keshet I, Farkash S, Hecht M, Zimmerman J, Eden E, Yakhini Z, Ben-Shushan E, Reubinoff BE, Bergman Y, Simon I, Cedar H. (2007). Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet* 39: 232-236.

Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G (2007) Genome regulation by Polycomb and trithorax proteins. *Cell* 128: 735-45.

Schwanzel-Fukada M, Pfaff DW (1989) Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* 338: 161-4.

Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW (1990) The migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons from the medial olfactory placode into the medial basal forebrain. *Experientia* 46: 956-62. Review

- Schwanzel-Fukuda M (1999)** Origin and migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in mammals. *Microsc Res Tech* 44: 2-10. Review
- Scully KM, Rosenfeld MG (2002)** Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science* 295: 2231-2235
- Seila AC, Calabrese JM, Levine SS, Yeo GW, Rahl PB, Flynn RA, Young RA, Sharp PA (2008)** Divergent transcription from active promoters. *Science* 322: 1849-51.
- Shacham S, Harris D, Ben-Shlomo H, Cohen I, Bonfil D., Przedecki F, Lewy H., Ashkenazi IE, Seger R, Naor Z (2001)** Mechanism of GnRH receptor signaling on gonadotropin release and gene expression in pituitary gonadotrophs. *Vitam Horm.*63: 63–90
- Sharma S, Kelly TK, Jones PA (2010)** Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31: 27-36.
- Shawlot W, Behringer RR (1995)** Requirement for *Lim1* in head-organizer function. *Nature* 374: 425-30.
- Sheng HZ, Moriyama K, Yamashita T, Li H, Potter SS, Mahon KA, Westphal H (1997)** Multistep control of pituitary organogenesis. *Science* 278: 1809-1812
- Sheng HZ, Zhadanov AB, Mosinger B Jr, Fujii T, Bertuzzi S, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Mahon KA, Westphal H (1996)** Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene *Lhx3*. *Science* 272: 1004-1007
- Shimomura H, Sanke T, Hanabusa T, Tsunoda K, Furuta H, Nanjo K (2000)** Nonsense mutation of *Islet-1* gene (Q310X) found in a type 2 diabetic patient with a strong family history. *Diabetes* 49: 1597–1600
- Shirasaki R, Pfaff SL (2002)** Transcriptional codes and the control of neuronal identity. *Annu Rev Neurosci* 25: 251-81. Review
- Sibley DR, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz R.J (1987)** Regulation of transmembrane signaling by receptor phosphorylation. *Cell* 48: 913–922
- Simon JA, Kingston RE (2009)** Mechanisms of Polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 697-708. Review
- Sing A, Pannell D, Karaiskakis A, Sturgeon K, Djabali M, Ellis J, Lipshitz HD, Cordes SP (2009)** A vertebrate Polycomb response element governs segmentation of the posterior hindbrain. *Cell* 138: 885-97.
- Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA (2006)** *KiSS-1* neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol* 18: 298-303
- Spector DL, Lamond AI (2011)** Nuclear speckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3. Review
- Statham AL, Robinson MD, Song JZ, Coolen MW, Stirzaker C, Clark SJ (2012)** Bisulfite sequencing of chromatin immunoprecipitated DNA (BisChIP-seq) directly informs methylation status of histone-modified DNA. *Genome Res* 22: 1120-7
- Sterner DE, Berger SL (2000)** Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 435-59. Review
- Strahl BD, Allis CD (2000)** The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41-5.
- Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD (1998)** A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet* 18: 213–215
- Sugihara TM, Bach I, Kioussi C, Rosenfeld MG, Andersen B (1998)** Mouse deformed epidermal autoregulatory factor 1 recruits a LIM domain factor, LMO-4, and CLIM coregulators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15418-23.
- Sundaresan S, Colin IM, Pestell RG, Jameson JL (1996)** Stimulation of mitogen-activated protein kinase by gonadotropin-releasing hormone: evidence for the involvement of protein kinase C. *Endocrinology* 137: 304-311

Suzuki MM, Bird A (2008) DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 9: 465-76. Review

T

Takuma N, Sheng HZ, Furuta Y, Ward JM, Sharma K, Hogan BL, Pfaff SL, Westphal H, Kimura S, Mahon KA (1998) Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. *Development* 125: 4835-4840

Tamaru H, Selker EU (2001) A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 414: 277-83.

Tanaka S, Nomizu M, Kurosumi K (1991) Intracellular sites of proteolytic processing of pro-opiomelanocortin in melanotrophs and corticotrophs in rat pituitary. *J Histochem Cytochem* 39: 809-21.

Tanaka S, Yora T, Nakayama K, Inoue K, Kurosumi K (1997) Proteolytic processing of pro-opiomelanocortin occurs in acidifying secretory granules of AtT-20 cells. *J Histochem Cytochem* 45: 425-36.

Tashjian AH Jr, Bancroft FC, Levine L (1970) Production of both prolactin and growth hormone by clonal strains of rat pituitary tumor cells. Differential effects of hydrocortisone and tissue extracts. *J Cell Biol* 47: 61-70.

Teperek-Tkacz M, Pasque V, Gentsch G, Ferguson-Smith AC (2011) Epigenetic reprogramming: is deamination key to active DNA demethylation? *Reproduction* 142: 621-32. Review

Thaler J, Harrison K, Sharma K, Lettieri K, Kehl J, Pfaff SL (1999) Active suppression of interneuron programs within developing motor neurons revealed by analysis of homeodomain factor HB9. *Neuron* 23: 675-87.

Thaler JP, Koo SJ, Kania A, Lettieri K, Andrews S, Cox C, Jessell TM, Pfaff SL (2004) A postmitotic role for Isl-class LIM homeodomain proteins in the assignment of visceral spinal motor neuron identity. *Neuron* 41: 337-50.

Thaler JP, Lee SK, Jurata LW, Gill GN, Pfaff SL (2002) LIM factor Lhx3 contributes to the specification of motor neuron and interneuron identity through cell-type-specific protein-protein interactions. *Cell* 110: 237-249

Thomas P, Mellon P, Turgeon JL, Waring DW (1996) The L β T2 clonal gonadotrope: a model for single cell studies of endocrine cell secretion. *Endocrinology* 137: 2979-2989

Thomson JP, Skene PJ, Selfridge J, Clouaire T, Guy J, Webb S, Kerr AR, Deaton A, Andrews R, James KD, Turner DJ, Illingworth R, Bird A (2010) CpG islands influence chromatin structure via the CpG-binding protein Cfp1. *Nature* 464: 1082-6

Thor S, Thomas JB (1997) The *Drosophila* islet gene governs axon pathfinding and neurotransmitter identity. *Neuron* 18: 397-409

Thor, S, Ericson, J, Brannstrom, T., Edlund, T (1991) The homeodomain LIM protein Isl-1 is expressed in subsets of neurons and endocrine cells in the adult rat. *Neuron*, 7: 881-889.

Tixier-Vidal A, Brunet N, Gourdji D (1978) Morphological and molecular aspects of the regulation of prolactin secretion by rat pituitary cells lines. *Progress in prolactin physiology and pathology*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press: 29-43

Treier M, Rosenfeld MG (1996) The hypothalamic-pituitary axis: co-development of two organs. *Curr Opin Cell Biol* 8: 833-43.

Treier M, Gleiberman AS, O'Connell SM, Szeto DP, McMahon JA, McMahon AP, Rosenfeld MG. (1998) Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis *in vivo*. *Genes Dev* 12: 1691-1704

Tsai PS (2006) Gonadotropin-releasing hormone in invertebrates: structure, function, and evolution. *Gen Comp Endocrinol* 148: 48-53.

Tsuchida T, Ensini M, Morton SB, Baldassare M, Edlund T, Jessell TM, Pfaff SL. (1994) Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes. *Cell* 79: 957-70.

Tsutsui K, Bentley GE, Bedecarrats G, Osugi T, Ubuka T, Kriegsfeld LJ (2010) Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and its control of central and peripheral reproductive function. *Front Neuroendocrinol* 31: 284-295

Tsutsumi M, Zhou W, Millar RP, Mellon PL, Roberts JL, Flanagan CA, Dong K, Gillo B, Sealfon SC (1992) Cloning and functional expression of a mouse gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol Endocrinol* 6: 1163-1169

Turgeon JL, Kimura Y, Waring DW, Mellon PL (1996) Steroid and pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) regulation of luteinizing hormone and GnRH receptor in a novel gonadotrope cell line. *Mol Endocrinol* 10: 439-450

urner BM (2002) Cellular memory and the histone code. *Cell* 111: 285-91 Review

u

Uemura O, Okada Y, Ando H, Guedj M, Higashijima S, Shimazaki T, Chino N, Okano H, Okamoto H (2005) Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the *isl1* gene for motor and sensory neuron-specific expression. *Dev Biol* 278: 587-606

Utlej RT, Côté J (2003) The MYST family of histone acetyltransferases. *Curr Top Microbiol Immunol* 274: 203-36.

v

Vacher P (1995) Gn-RH agonists in the treatment of prostatic carcinoma. *Biomed Pharmacother* 49: 325-331

Vankelecom H (2010) Pituitary stem/progenitor cells: embryonic players in the adult gland? *Eur J Neurosci* 32: 2063-81. Review

Villa-Porcile E (1972) [The network of the folliculo-stellate cells and the follicles of the adenohypophysis in the rat (*pars distalis*)] *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 129: 328-369.

Vincze B, Palyi I, Daubner D, Kremmer T, Szamel I, Bodrogi I, Sugar J, Seprödi J, Mezo I, Teplan I et al (1991) Influence of luteinizing hormone-releasing hormone agonists on human mammary carcinoma cell lines and their xenografts J. Steroid. *Biochem Mol Biol* 38: 119–126

w

Wang HF, Liu FC (2001) Developmental restriction of the LIM homeodomain transcription factor *Isl-1* expression to cholinergic neurons in the rat striatum. *Neuroscience* 103: 999-1016.

Wang J, Hevi S, Kurash JK, Lei H, Gay F, Bajko J, Su H, Sun W, Chang H, Xu G, Gaudet F, Li E, Chen T (2009) The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat Genet* 41: 125-9

Wang L, Bogerd J, Choi HS, Seong JY, Soh JM, Chun SY, Blumenrör M, Troskie BE, Millar RP, Kwon HB (2001) Three distinct types of gonadotropin-releasing hormone receptor characterized in the bullfrog. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 361–366

Wang M, Drucker DJ (1995) The LIM domain homeobox gene *isl-1* is a positive regulator of islet cell-specific proglucagon gene transcription. *J Biol Chem* 270: 12646–12652.

Wang M, Drucker DJ. (1996) Activation of amylin gene transcription by LIM domain homeobox gene *isl-1*. *Mol Endocrinol* 10: 243–251.

Watanobe H (2002) Leptin directly acts within the hypothalamus to stimulate gonadotropin-releasing hormone secretion *in vivo* in rats. *J Physiol* 545: 255–268

Way JC, Chalfie M (1988) *mec-3*, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*. *Cell* 54: 5–16.

Weiner RI, Wetsel W, Goldsmith P, Martinez de la Escalera G, Windle J, Padula C, Choi A, Negro-Vilar A, Mellon P (1992) Gonadotropin-releasing hormone neuronal cell lines. *Front Neuroendocrinol* 13: 95–119

West BE, Parker GE, Savage JJ, Kiratipranon P, Toomey KS, Beach LR, Colvin SC, Sloop KW, Rhodes SJ (2004) Regulation of the follicle-stimulating hormone β gene by the LHX3 LIM-homeodomain transcription factor. *Endocrinology* 145: 4866–4879

Wetsel WC, Mellon PL, Weiner RI, Negro-Vilar A (1991) Metabolism of pro-luteinizing hormone-releasing hormone in immortalized hypothalamic neurons. *Endocrinology* 129: 1584–95.

Wilson MD, Barbosa-Morais NL, Schmidt D, Conboy CM, Vanes L, Tybulewicz VL, Fisher EM, Tavaré S, Odom DT (2008) Species-specific transcription in mice carrying human chromosome 21. *Science* 322: 434–8

Windle JJ, Weiner RI, Mellon PL (1990) Cell Lines of the pituitary gonadotrope lineage derived by targeted oncogenesis in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 4: 597–603.

Woo CJ, Kharchenko PV, Daheron L, Park PJ, Kingston RE (2010) A region of the human HOXD cluster that confers Polycomb-group responsiveness. *Cell* 140: 99–110.

Wu S, Wilson MD, Busby ER, Isaac ER, Sherwood NM (2010a) Disruption of the single copy gonadotropin-releasing hormone receptor in mice by gene trap: severe reduction of reproductive organs and functions in developing and adult mice. *Endocrinology* 151: 1142–1152

Wu Y, Luo H, Liu J, Kang D, McNeilly AS, Cui S. (2010b) LIM homeodomain transcription factor *Isl-1* enhances follicle stimulating hormone- β and luteinizing hormone- β gene expression and mediates the activation of leptin on gonadotropin synthesis. *Endocrinology* 151: 4787–4800.

Wysocka J, Swigut T, Milne TA, Dou Y, Zhang X, Burlingame AL, Roeder RG, Brivanlou AH, Allis CD (2005) WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* 121: 859–72.

X

Xia L, Van Vugt D, Alston EJ, Luckhaus J, Ferin M (1992) A surge of gonadotropin-releasing hormone accompanies the estradiol-induced gonadotropin surge in the rhesus monkey. *Endocrinology* 131: 2812–2820

Xuan YT, Tang XL, Qiu Y, Banerjee S, Takano H, Han H, Bolli R (2000) Biphasic response of cardiac NO synthase isoforms to ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H2360–71

Y

Yang L, Lin C, Liu W, Zhang J, Ohgi KA, Grinstein JD, Dorrestein PC, Rosenfeld MG (2011) ncRNA- and Pc2 methylation-dependent gene relocation between nuclear structures mediates gene activation programs. *Cell* 147: 773-88.

Yang X, Lay F, Han H, Jones PA (2010) Targeting DNA methylation for epigenetic therapy. *Trends Pharmacol Sc* 31: 536-546. Review

Yura S, Ogawa Y, Sagawa N, Masuzaki H, Itoh H, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Fujii S, Nakao K (2000) Accelerated puberty and late-onset hypothalamic hypogonadism in female transgenic skinny mice. *J Clin Invest* 105: 749–755

Z

Zhang D, Weinstein H (1994) Polarity conserved positions in transmembrane domains of G-protein coupled receptors and bacteriorhodopsin. *FEBS Lett* 337: 207-12.

Zhang FP, Rannikko A, Huhtaniemi I (1995) Isolation and characterization of testis-specific cDNAs for luteinizing hormone beta-subunit in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 210: 858-865

Zhang Y, Reinberg D (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 15: 2343-60. Review

Zhang H, Wang WP, Guo T, Yang JC, Chen P, Ma KT, Guan YF, Zhou CY. (2009) The LIM-homeodomain protein ISL1 activates insulin gene promoter directly through synergy with BETA2. *J Mol Biol* 392: 566-77.

Zhang Y, Jurkowska R, Soeroes S, Rajavelu A, Dhayalan A, Bock I, Rathert P, Brandt O, Reinhardt R, Fischle W, Jeltsch A (2010) Chromatin methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3a/3L is guided by interaction of the ADD domain with the histone H3 tail. *Nucleic Acids Res* 38: 4246-53.

Zhao Y, Guo YJ, Tomac AC, Taylor NR, Grinberg A, Lee EJ, Huang S, Westphal H. (1999b) Isolated cleft palate in mice with a targeted mutation of the LIM homeobox gene *lhx8*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 15002-6.

Zhao Y, Marín O, Hermes E, Powell A, Flames N, Palkovits M, Rubenstein JL, Westphal H. (2003) The LIM-homeobox gene *Lhx8* is required for the development of many cholinergic neurons in the mouse forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 9005-10.

Zhao Y, Morales DC, Hermes E, Lee WK, Pfaff SL, Westphal H. (2006) Reduced expression of the LIM-homeobox gene *Lhx3* impairs growth and differentiation of Rathke's pouch and increases cell apoptosis during mouse pituitary development. *Mech Dev* 123: 605-13.

Zhao Y, Sheng HZ, Amini R, Grinberg A, Lee E, Huang S, Taira M, Westphal H. (1999a) Control of hippocampal morphogenesis and neuronal differentiation by the LIM homeobox gene *Lhx5*. *Science* 284: 1155-8.

Zheng Q, Zhao Y (2007) The diverse biofunctions of LIM domain proteins: determined by subcellular localization and protein-protein interaction. *Biol Cell* 99: 489-502.

Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, Wu SM, Domian I, Rivera-Feliciano J, Jiang D, von Gise A, Ikeda S, Chien KR, Pu WT (2008) Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* 454: 109-13.

Zhou W, Sealfon SC (1994) Structure of the mouse gonadotropin-releasing hormone receptor gene: variant transcripts generated by alternative processing. *DNA Cell Biol* 13: 605-614

Zhu H, Wang H, Ascoli M (1995) The lutropin/choriogonadotropin receptor is palmitoylated at intracellular cysteine residues. *Mol Endocrinol* 9: 141–150

Zhu X, Gleiberman AS, Rosenfeld MG (2007a) Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol Rev* 87: 933-963

Zhu X, Wang J, Ju BG, Rosenfeld MG (2007b) Signaling and epigenetic regulation of pituitary development. *Curr Opin Cell Biol* 19: 605-11.

"REDRESSEZ-VOUS, PRENEZ L'ESPRIT"

**"Redressez-vous, prenez l'Esprit
Comme une voile prend le vent :
Ne l'enfermez pas en vous-mêmes,
Mais priez d'enfler vos cris,
- Qu'ils soient d'impatience ou de joie !
Vous savez bien de quel baptême
Vous renaissiez souffles vivants.
Dépliez-vous ! Prenez l'Esprit
Comme une voile prend le vent :
En le prenant, soyez sa proie !**

**Laissez la chair, prenez l'Esprit
Comme les chaumes prennent feu :
Réjouissez-vous qu'il consume
En vous ce qui n'est pas la vie :
- Il est le Seigneur qui pourvoit !-
Exposez tout à sa brûlure
En un présent qui plaise à Dieu.
Resplendissez ! Prenez l'Esprit
Comme les chaumes prennent feu :
En le prenant, soyez sa proie !**

**Ne craignez rien, prenez l'Esprit
Comme une barque prend la mer :
Rompez toute amarre à ce monde
Puisque vous n'êtes pas de lui :
- Pourquoi vous ancrer à ses lois ?
Gagnez le large en eau profonde,
Oublieux des abris d'hier.
Sortez de vous ! Prenez l'Esprit
Comme une barque prend la mer :
En le prenant, soyez sa proie ! "**

Prière composée par Didier Rimaud
« *A force de colombe* »

